

**Der Einfluss bakterieller Aktivität
auf die Präservierung und den Abbau von
Weichgewebe**

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

M.Sc. Kathrin Janssen

aus

Düren

Bonn, den 27.10.2021

Die vorliegende Arbeit wurde mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn am Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Parasitologie (IMMIP) unter Leitung von Frau Prof. Dr. rer. nat. Gabriele Bierbaum angefertigt.

Erstgutachterin: Prof. Dr. rer. nat. Gabriele Bierbaum
Zweitgutachter: Prof. Dr. rer. nat. Martin Sander
Fachnahes Mitglied: Prof. Dr. rer. nat. Lukas Schreiber
Fachangrenzendes Mitglied: Dr. rer. nat. Marianne Engeser

Tag der Promotion: 24.01.2022
Erscheinungsjahr: 2022

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis.....	V
Abbildungsverzeichnis	VI
1. Einleitung	8
1.1. Bakterielle Aktivität und Mineralisierung.....	11
1.1.1. Biomineralisierung	12
1.1.2. Organomineralisierung in Kombination mit biologisch induzierter Mineralisierung	13
1.1.4. Mineralisierung von bakteriellen Zellen	15
1.2. Biofilm & Mikrobielle Matten	16
1.2.1. Biofilme, mikrobielle Matten und Fossilisierung.....	18
1.3. 16S-rRNA-Amplikon-Analyse.....	20
1.4. Ziel der Arbeit	21
2. Material und Methoden	23
2.1. Verwendete Chemikalien & Materialien.....	23
2.2. Verwendete Kits.....	24
2.3. Verwendete Software	24
2.4. Verwendete Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	25
2.5. Medien und Puffer.....	26
2.6. Grundlagen der Molekularbiologie	27
2.6.1. Stammhaltung und allgemeine Vorgehensweisen.....	27
2.6.2. Messung der DNA- und RNA-Konzentration.....	27
2.6.3. Polymerase-Ketten-Reaktion der 16S-rRNA-Fragmente.....	28
2.6.4. Agarose-Gelelektrophorese.....	30
2.6.5. Aufreinigung des PCR-Produktes	30
2.7. Versuchsreihen.....	30
2.7.1. Vorversuche & Versuchsaufbau.....	32
2.7.2. Kontrollen des Kits.....	33
2.7.3. Extraktion der bakteriellen DNA der gesamten Probe	34
2.7.4. 16S-rRNA-Amplikon Sequenzierung (Illumina)	35
2.7.5. Bioinformatische Analyse der Rohdaten.....	35
2.7.2. Sterilisierung des Krebsgewebes.....	37
2.8. Isolation von Organismen & Charakterisierung.....	38
2.8.1. Isolation der Organismen	38
2.8.2. Charakterisierung der isolierten Organismen.....	42
2.9. Raman-Spektroskopie	47

2.9.1.	Raman-Effekt	47
2.9.2.	Raman-Spektrometer.....	48
2.10.	Differenzierung von toten und lebenden Zellen (RNA-Isolation).....	48
3.	Ergebnisse	51
3.1.	Vorversuche	52
3.2.	Kontrollen zum Kit	55
3.3.	Versuchsreihen.....	57
3.3.1.	Qualität der Sequenzierungen	58
3.3.2.	Ausgangssituation der Versuchsreihen.....	61
3.3.3.	Verlauf der mikrobiellen Gemeinschaft in den Versuchsreihen	65
3.3.4.	Bioinformatische Vorhersagung metagenomischer Funktionen	75
3.4.	Isolation und Charakterisierung von Bakterien aus den Versuchsreihen	82
4.	Diskussion.....	94
4.1.	Versuchsreihen.....	95
4.1.1.	Kontrollen.....	95
4.1.2.	Mikrobiom der Flusskrebse.....	97
4.1.3.	Verlauf der mikrobiellen Gemeinschaft in den Versuchsreihen	100
4.1.4.	Weitere abiotische Faktoren.....	113
4.2.	Isolation der Organismen	120
4.3.	Schwierigkeiten mit der Methodik.....	122
	Zusammenfassung	127
	Publizierte Kooperationsprojekte	129
	DNA aus in Harz eingeschlossenen Organismen (Peris <i>et al.</i> , 2020).....	129
	Mikrobielle Diversität auf Seerosenblättern: Vergleich von vier DNA-Extraktions- Methoden (Janssen <i>et al.</i> , 2021)	135
	Literaturverzeichnis.....	139
	Publikationen.....	169
	Danksagung	171

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
(v/v)	engl. volume per volume (Volumenanteil)
(w/v)	engl., weight per volume (Gewichtsanteil)
°C	Grad Celsius
μCT	engl. micro computed tomography (Mikro-Computertomographie)
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
ad.	lat. zu, auffüllen auf
ASV	engl. amplicon sequencing variant (Amplikonsequenziervariante)
AT	Österreich
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosintriphosphate
bp	Basenpaar
bspw.	beispielsweise
bzw.	beziehungsweise
ca.	lat. circa, ungefähr
CH	Schweiz
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
COL	Columbia
DE	Deutschland
dH ₂ O	demineralisiertes Wasser
DNA	engl. desocyrbonucleic acid (Desoxyribonucleinsäure)
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
engl.	englisch
<i>et al.</i>	et alii = und andere
for	forward
FR	Frankreich
g	Gramm
Ga	Giga-Jahr, Jahrmilliarde
h	Stunde
HCl	Salzsäure
JPN	Japan
l	Liter
lat.	lateinisch
LB	Lysogeny Broth
Leu – L	Leucin
M	Molar (mol/l)
Ma	Jahrmillion, Millionen Jahre
max.	maximal
mb	Megabasen
mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumdichlorid
MH	Müller-Hinton
MilliQ-Wasser	Wasser aus der Reinstwasseranlage
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar (mmol/l)

M	Molar (mol/l)
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NMDS	engl. non-metric multidimensional scaling (Nicht-metrische multidimensionale Skalierung)
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm
OTU	engl. operational taxonomic unit
PCR-H ₂ O	Ampuwa®-Wasser
pH	lat. Potentia Hydrogenii, negativer dekadischer Logarithmus der H ⁺ Konzentration
rev	reverse
RNA	engl. ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
sp.	Spezies
subsp.	Subspezies
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TSB	Tryptic Soy Broth
üN	über Nacht
USA	Vereinigte Staaten von Amerika
UV	Ultraviolett
V	Volumen
V1	Versuchsreihe 1
V2	Versuchsreihe 2
V3	Versuchsreihe 3
V4	Versuchsreihe 4
V5	Versuchsreihe 5
V6	Versuchsreihe 6
V7	Versuchsreihe 7
V8	Versuchsreihe 8
vgl.	vergleiche
x g	Gravitationskonstante
z.B.	Zum Beispiel
α	alpha
β	beta

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht über die verwendeten Chemikalien mit Herstellerangaben.	23
Tabelle 2: Übersicht über die verwendeten Kits mit Herstellerangaben.	24
Tabelle 3: Übersicht über die verwendete Software und Programme.	24
Tabelle 4: Übersicht über die verwendeten Geräte und Verbrauchsmaterialien.	25
Tabelle 5: Übersicht über die verwendeten Medien.	26
Tabelle 6: Übersicht über die verwendeten Primer. ..	28
Tabelle 7: Zusammensetzung der PCR-Ansätze und Übersicht über die PCR-Programme.	29
Tabelle 8: Zusammensetzung des ZymoBIOMICS Microbial Community Standards.	34
Tabelle 9: Übersicht über die Primer und das PCR-Programm, die von der Sequenzierfirma (MR DNA) zur Amplifikation der 16S-rRNA-Gensequenz verwendet wurden.	35
Tabelle 10: Übersicht über die verwendeten Pakete in R.	37
Tabelle 11: Zusammensetzung des Minimalmediums.	39
Tabelle 12: Zusammensetzung des Chitin-Salts-Agars.	42
Tabelle 13: Zusammensetzung des Skim-Milk-Agars.	43
Tabelle 14: Zusammensetzung des Rhodamin-Olive-Oil-Agars.	44
Tabelle 15: Zusammensetzung des Urease-Agars.	45
Tabelle 16: Schema zur Einordnung der Fähigkeit einen Biofilm auszubilden.	46
Tabelle 17: Zusammensetzung des 4 x mB4-Mediums.	47
Tabelle 18: Zusammensetzung des Ansatzes und des PCR-Programms zur Synthese der cDNA mit dem LunaScript® RT SuperMix Kit.	50
Tabelle 19: Übersicht über die abiotischen und biotischen Parameter der Versuchsreihen.	58
Tabelle 20: Übersicht über die Anzahl und Länge der ASVs, die mit den Rohdaten der acht Versuchsreihen generiert werden konnten.	59
Tabelle 21: Ergebnisse der PERMANOVA-Analyse.	61
Tabelle 22: Übersicht über die dominierenden Genera in den Gewebeproben vor Beginn der Versuchsreihen. .	64
Tabelle 23: Beispielhaftes Ergebnis des Abgleiches der 16S-rRNA-Sequenz eines unbekanntes Organismus mit der Datenbank EZBioCloud.	83
Tabelle 24: Übersicht über die unterschiedlichen Kristallstrukturen.	89
Tabelle 25: Vergleich der Genera im Gewebe von <i>C. diminutus</i> mit der Literatur zu Individuen der Ordnung Decapoda.	98
Tabelle 26: Übersicht über die Primer, die zur Amplifikation der DNA aus Mitosoma sp. verwendet wurden.	130
Tabelle 27: Ergebnisse der Tests zu einer möglichen Inhibition der Polymerase durch Bestandteile des Baumharzes.	131
Tabelle 28: Ergebnisse der Sequenzvergleiche von DNA aus in Harz eingeschlossenen und rezenten Käfern. .	133

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Fossilien aus den deutschen Konservat-Lagerstätten Messel (Eozän, Hessen) und Eichstätt-Solnhofen (Oberjura, Bayern).....	8
Abbildung 2: Schematische Darstellung der 16S-rRNA-Genregion von Bakterien.....	20
Abbildung 3: Übersicht über die Versuchsreihen und die unterschiedlichen abiotischen und biotischen Bedingungen.....	31
Abbildung 4: Übersicht über den Versuchsaufbau und die Probenahmetage.....	32
Abbildung 5: Graphische Darstellung der Bindungsstellen der verwendeten Sequenzierprimer.....	41
Abbildung 6: Mikroskopische Untersuchung der Agarplatte.....	47
Abbildung 7: Graphische Darstellung des Grundprinzips der RAMAN-Spektroskopie.....	48
Abbildung 8: Versuchsaufbau der Vorversuche.....	52
Abbildung 9: Vergleich der α -Diversität (Shannon-Index) und der Anzahl der Genera in den Vorversuchen.....	53
Abbildung 10: Analyse der Effizienz eines vorgeschalteten Filtrationsschrittes zur Entfernung von Protozoen..	54
Abbildung 11: Prozentuale Verteilung der einzelnen Genera in der bekannten, mikrobiellen Gemeinschaft.....	56
Abbildung 12: Prozentuale Verteilung der Genera in den Leerproben.....	57
Abbildung 13: Rarefaction-Kurve zur Analyse der Sequenziertiefe anhand der α -Diversität (Shannon-Index)...	60
Abbildung 14: Mikrobielle Verteilung in den Wassernullproben.....	62
Abbildung 15: Prozentuale Verteilung der Genera im Sediment zu vier verschiedenen Jahreszeiten.....	63
Abbildung 16: Mikrobielle Zusammensetzung in den Gewebeproben an Tag 1.....	65
Abbildung 17: Schematische Darstellung der Körperteile und Organe eines Flusskrebsses.....	66
Abbildung 18: Ergebnisse der mikrobiologischen und morphologischen Analysen der Versuchsreihen 1 (aerob, 24 °C, unsteriles Seewasser) und 5 (anaerob, 24 °C, unsteriles Seewasser).....	68
Abbildung 19: Ergebnisse der mikrobiologischen und morphologischen Analysen der Versuchsreihen 2 (aerob, 24 °C, steriles Seewasser) und 6 (anaerob, 24 °C, steriles Seewasser).....	69
Abbildung 20: Ergebnisse der mikrobiologischen und morphologischen Analysen der Versuchsreihen 3 (aerob, 4 °C, unsteriles Seewasser) und 7 (anaerob, 4 °C, unsteriles Seewasser).....	72
Abbildung 21: Ergebnisse der mikrobiologischen und morphologischen Analysen der Versuchsreihen 4 (aerob, 4 °C, steriles Seewasser) und 8 (anaerob, 4 °C, steriles Seewasser).....	74
Abbildung 22: Graphische Darstellung der Gram-Verteilung innerhalb der Proben in den verschiedenen Versuchsreihen über den gesamten Versuchsverlauf.....	76
Abbildung 23: Verteilung der Bakterien in den Versuchsreihen aufgeteilt nach ihrer Sauerstofftoleranz über die gesamte Versuchsdauer.....	78
Abbildung 24: Anzahl der Bakterien, die in der Lage sind einen Biofilm zu bilden.....	79
Abbildung 25: Verteilung der Bakterien, die bestimmte Enzyme synthetisieren können über die gesamte Versuchsdauer in den einzelnen Versuchsreihen.....	81
Abbildung 26: MALDI-TOF/MS Spektren zur Identifizierung unbekannter Isolate.....	83
Abbildung 27: Übersicht über die isolierten Organismen und ihre speziellen Eigenschaften.....	86
Abbildung 28: Übersicht über die Anzahl der Organismen die Exoenzyme zum Abbau von Weichgewebe synthetisieren können.....	87
Abbildung 29: Übersicht über die Eigenschaften der isolierten Organismen, die einen Erhalt des Weichgewebes begünstigen können.....	88
Abbildung 30: Besondere Kristallstrukturen, die auf dem speziellen 4 x mB4-Agar ausgebildet wurden.....	91
Abbildung 31: Vermehrte Ausbildung von Kristallstrukturen im und auf dem Agar zwischen zwei Bakterienkolonien am Beispiel des Organismus <i>Paenarthrobacter ilicis</i>	92
Abbildung 32: Ergebnisse der RAMAN-Spektroskopie der Kristallstrukturen.....	93

Abbildung 33: Bildung von Kalzit-Kristallen innerhalb der Flusskrebse bei 24 °C.....	112
Abbildung 34: Vergleich der Datenbanken für die taxonomische Zuordnung der ASVs.	123
Abbildung 35: Harzproben mit eingeschlossenen Käfern der Gattung Mitosoma (Platypodinae).	130
Abbildung 36: Vergleich der DNA-Konzentrationen aus Mitosoma-Proben verschiedenen Ursprungs.....	131
Abbildung 37: Strategien zur erfolgreichen Amplifikation der Genregionen S28 und COI1 aus der DNA von Mitosoma sp.	132
Abbildung 38: Überprüfung der Primer COI1Res zur Vervielfältigung sehr kleiner DNA-Fragmente aus älteren Mitosoma-Proben.....	134
Abbildung 39: Ergebnisse der DNA-Extraktion und 16S-rRNA-Amplikon-Analyse der bekannten, mikrobiellen Gemeinschaft (ZymoBIOMICS Microbial Community Standard).	136
Abbildung 40: Vergleich der mikrobiellen Gemeinschaft anhand der taxonomischen Ränge in zwei verschiedenen Blattproben.	138

1. Einleitung

1. Einleitung

Der Begriff Fossil, der sich aus den lateinischen Wörtern „fossilis/fodere“ (ausgegraben/graben) ableitet, bezeichnet die Abbildung eines Organismus (Tiere, Pflanzen) durch z.B. Gesteinsabdrücke, Steinkerne oder dem Einschluss in Bernstein (Toepfer, 2011). Ein Grundbaustein der Paläontologie ist die Analyse solcher Fossilfunde, wodurch Rückschlüsse auf die Evolution und Phylogenie der Lebewesen und die Umweltbedingungen früherer Zeitabschnitte gezogen werden können. Konzentrat- und Konservatlagerstätten, die sich entweder durch besonders viele oder außergewöhnlich gut erhaltene Fossilfunde auszeichnen, können Einblicke in die Präservierung von Hart- und Weichgewebe geben (Briggs, 2001; Seilacher, 1970; Seilacher *et al.* 1985). Bekannte Konservatlagerstätten in Deutschland sind die Grube Messel (Eozän, Hessen) und Eichstätt-Solnhofen (Oberjura, Bayern). Sie zeichnen sich durch exzellent erhaltenes Weichgewebe von beispielsweise verschiedenen Insekten- und Wirbeltierarten, oder Teile eines Archaeopteryx aus (siehe Abbildung 1; Arratia *et al.*, 2015; Seilacher *et al.*, 1985).

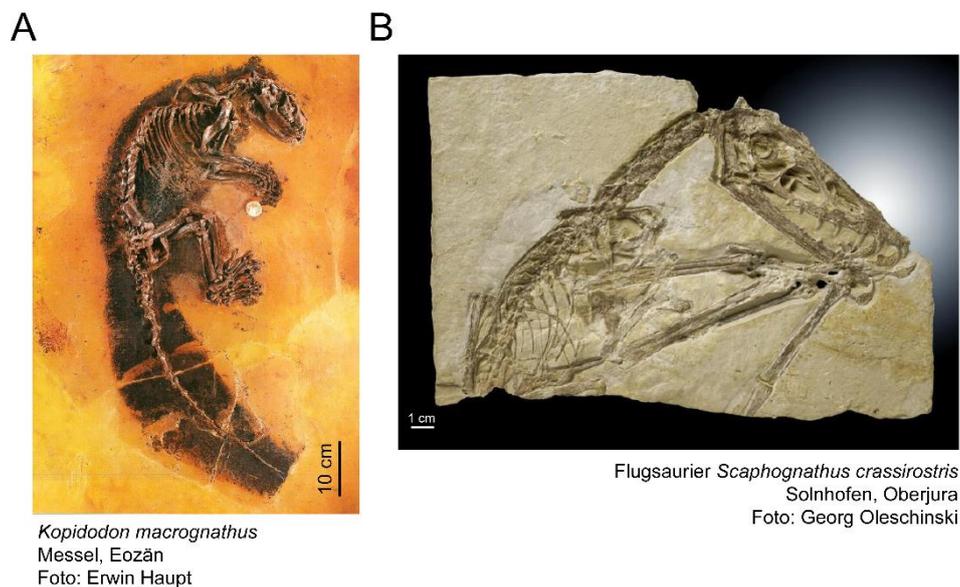


Abbildung 1: Fossilien aus den deutschen Konservatlagerstätten Messel (Eozän, Hessen) und Eichstätt-Solnhofen (Oberjura, Bayern). Die Bilder sind aus Königswald & Storch, 1998 (A) und der Sammlung der paläontologischen Abteilung (B, Institut für Geowissenschaften, Bonn).

Biominalisiertes Hartgewebe, wie Schalen, Knochen oder Zähne, ist deutlich resistenter gegen Abbau und bleibt deshalb häufiger als Fossil erhalten. Da jedoch nicht alle Organismen solche Gewebsstrukturen aufweist, ist der Informationsgehalt, den sie über die Diversität früher

1. Einleitung

Lebensgemeinschaften liefern, gering (Briggs, 2003). Im Vergleich dazu kann fossiles Weichgewebe die Phylogenie und Verteilung ausgestorbener Organismen besser abbilden. Allerdings ist die Fossilisation dieses sehr labilen Gewebes ein extrem seltenes Ereignis, das häufig auf kurzzeitigen Veränderungen der Umweltbedingungen durch Katastrophen, wie z.B. Erdbeben, basiert. Normalerweise wird totes Material lediglich recycelt und die einzelnen Bestandteile dienen anderen Organismen als Nahrungsquelle. Besonders Bakterien und Pilze spielen eine große Rolle in der Zersetzung von organischer Substanz, da sie als Destruenten für den vollständigen Abbau zuständig sind. Welche Bedingungen dazu führen, dass Weichgewebe den Zersetzungsprozess überdauert und Millionen von Jahren später als Fossil aufgefunden werden kann, sind noch nicht detailliert aufgeklärt, wobei insbesondere der Einfluss von Mikroorganismen kaum erforscht ist (Purnell *et al.*, 2018).

Die Fossilisation von Weichgewebe beruht vermutlich auf einem komplexen Balanceakt zwischen dem Abbau durch mikrobielle Aktivität und Autolyse und dem Erhalt durch stabilisierende Prozesse, wie Mineralisierung (Briggs, 2003). Nach dem Tod eines Organismus beginnt sofort die Zersetzung der abgestorbenen Zellen durch körpereigene, autolytische Enzyme, wie Proteasen, Lipasen und Amylasen, was zu einer gesteigerten Freisetzung nährstoffreicher Flüssigkeiten führt (Gibbons & Reed, 1930; Penning, 2006; Singhal *et al.*, 1992; Vass, 2001). Diese Nährstoffe und andere Abbauprodukte dienen im Anschluss den Bakterien als Lebensgrundlage, die die zweite Phase der aktiven Zersetzung beginnen. Die beteiligten Mikroorganismen sind sowohl auf und in dem Organismus selber, als auch in der Umgebung vorzufinden. Bakterielle Aktivität ist vor allem für die initialen Prozesse von großer Bedeutung und damit häufig eine Voraussetzung dafür, dass eine Präservierung von Weichgewebe stattfinden kann (Martin *et al.*, 2004; Sagemann *et al.*, 1999). Manche Studien gehen sogar davon aus, dass eine Erhaltung nur durch die Anwesenheit und Aktivität von Bakterien möglich ist (Martin *et al.*, 2004). Die hohe Abbaurate von heterotrophen Mikroorganismen führt zu einer starken Freisetzung von Ionen aus dem Kadaver und der umliegenden Umgebung (z.B. Sediment, Wasser). Hohe Ionen-Konzentrationen wiederum können eine Stabilisierung des Weichgewebes und eine erhöhte authigene Mineralisierung begünstigen, wodurch erste Schritte zum Erhalt des Gewebes eingeleitet werden (Jauvion *et al.*, 2020; Naimark *et al.*, 2016a, 2016b, 2018a, 2018b; Petrovich, 2001; Wilson & Butterfield, 2014). Damit ein abgestorbener Organismus zu einem Fossil wird, ist vor allem wichtig, dass ab einem gewissen Punkt die Mineralisierungsrate über der Abbaurate liegt (Allison, 1988; Briggs, 1995, 2003; Carpenter, 2005; Gehling, 1999; McNamara *et al.*, 2009; Sagemann *et al.*, 1999). Aus diesem Grund wird

1. Einleitung

davon ausgegangen, dass der mikrobielle Abbau zu einem bestimmten Zeitpunkt innerhalb des Präservierungsprozesses inhibiert oder zumindest reduziert werden muss. In der paläontologischen Forschung werden bestimmte abiotische Bedingungen als ausschlaggebend für die Reduktion der mikrobiellen Aktivität und somit einen guten Erhalt angesehen, obwohl viele dieser Annahmen bisher nicht lückenlos experimentell aufgeklärt werden konnten. So wird angenommen, dass anaerobe Bedingungen zu einer besseren Präservierung führen können, da die bakterielle Aktivität reduziert ist und anaerobe Stoffwechselwege dominieren (Briggs & Kear, 1993a, 1993b; Gostling *et al.*, 2009; Martin *et al.*, 2003). Viele dieser metabolischen Wege führen als Neben- oder Hauptprodukt zur Präzipitation von Mineralien, was wiederum förderlich für eine gute Erhaltung ist (Briggs & Kear, 1993a, 1993b, 1993c; Gostling *et al.*, 2009; Martin *et al.*, 2003). Dabei wird allerdings außer Acht gelassen, dass Bakterien vielfältige Anpassungen an verringerte Sauerstoffbedingungen aufweisen und dadurch die unterschiedlichsten Habitate besiedeln können. Viele anaerob lebende Bakterien können sogar stärkeren Abbau betreiben, als aerobe Mikroorganismen, was unter anderem an der Freisetzung großer Mengen an degradierenden Exoenzymen liegt (Fourie *et al.*, 2020). So benötigen Sulfat-reduzierende Organismen beispielsweise mehr Substrat, um die gleiche Menge an Energie generieren zu können wie aerobe Zersetzer (Allison, 1988; Canfield, 1994). Eines der effizientesten Bakterien, das eine Verdopplungszeit von nur 10 min aufweist, ist das strikt-anaerobe *Clostridium perfringens* (Labbe & Huang, 1995). Außerdem macht man sich gerade in Klär- und Müllverwertungsanlagen die Fähigkeit der Anaerobier, organisches Material abzubauen, zu nutzen (Gerardi, 2006). Unter anaeroben Bedingungen nutzen die Bakterien alternative Elektronenakzeptoren wie beispielsweise Nitrat, Sulfat, Fumarat oder unlösliches Fe(III) (Schlegel & Jannasch, 2006; Shan *et al.*, 2012; Uden *et al.*, 1994; Weber *et al.*, 2006). Fettsäuren können in den meisten Fällen nur unter Sauerstoff verstoffwechselt werden, sodass anaerobe Bedingungen zu unvollständig abgebauten Zwischenprodukten führen. Diese Wachs-ähnlichen Substanzen werden Leichenlipid (Adipocire) genannt und sind vermutlich ein Grund für die gute Erhaltung von Fossilfunden in den Konservatlagern Messel und Holzmaden (Schoenen & Schoenen, 2013; Schwermann *et al.*, 2012). Dass Bakterien unter extremen Bedingungen überleben und sich vermehren können, zeigt beispielsweise die Besiedelung verschiedener Quellbereiche im Cedar Creek in Nordkalifornien. Zum Teil weisen diese Quellen ultra-reduzierende ($E_h < -550$ mV) und hoch alkaline (pH ~ 12) Bedingungen auf und werden unter anderem von Spezies der Phyla Chloroflexi und Firmicutes besiedelt (Suzuki *et al.*, 2013).

1. Einleitung

Obwohl viele Bakterien extreme Bedingungen zumindest tolerieren können, kann die Zersetzung des Gewebes durch diese Umgebung verringert werden. So ist es wahrscheinlich, dass extreme, abiotische Faktoren in der Green River Formation in Nordamerika die abbauende Aktivität der Bakterien reduziert und das Wachstum besonderer alkali- und halophiler Organismen gefördert haben, was in einer Vielzahl an gut erhaltenen Fossilien resultiert hat. Es wird vermutet, dass diese Lagerstätte aus dem Eozän sehr alkalisch gewesen sein muss, da dort große Mengen an Trona ($\text{Na}_3(\text{HCO}_3)(\text{CO}_3) \times 2\text{H}_2\text{O}$) aufgefunden wurden, was auf einen pH über 11 hinweist (Gäb *et al.*, 2020). Exzellent erhaltene Fossilien aus dem Oberjura, bei denen die gute Präservierung vermutlich auf eine Reduzierung der bakteriellen Aktivität durch hohe Salzgehalte zurückzuführen ist, findet man im Solnhofener Plattenkalk. In dieser Lagerstätte wurde das hypersaline Tiefenwasser von Frischwasser überlagert (Gäb *et al.*, 2020). In verschiedenen hypersalinen Seen, wie dem „Lake Thetis“ in Australien, liegen in großer Anzahl Stromatoliten und Dolomiten vor (Grey *et al.*, 1990; Reitner *et al.*, 1996). Dolomite, die heutzutage nur sehr selten gebildet werden, waren vor allem im Kambrium und Präkambrium weit verbreitet. Es wird vermutet, dass die Bildung dieser Calcium-Magnesium-Carbonate auf die Aktivität halophiler, mikrobieller Matten zurückzuführen ist (Warthmann *et al.*, 2000; You *et al.*, 2013). Die speziellen Eigenschaften halophiler Organismen, vor allem ihr Einfluss auf die Mineralisierung, und die Reduktion von bakterieller Aktivität bei einem hohen Salzgehalt im Allgemeinen, machen hypersaline Standorte für die Analyse von Fossilisations- und Abbauprozessen sehr interessant.

Neben biomineralisiertem Hartgewebe, gibt es auch anderes Gewebe, das hauptsächlich unabhängig von bakterieller Aktivität erhalten bleiben kann. Solche schwer abzubauenen Strukturen, wie Melanin, konnten beispielsweise in Arthropoden- oder Pflanzengewebe nachgewiesen werden (Briggs, 1999; Briggs & Summons, 2014; Gupta *et al.*, 2006; McNamara *et al.*, 2016; Schweitzer, 2011).

1.1. Bakterielle Aktivität und Mineralisierung

Viele gut erhaltene Fossilien beruhen auf dem Prozess der authigenen Mineralisierung. Da die meisten Mineralisierungsschritte innerhalb von Stunden, Monaten oder wenigen Jahren geschehen, kann dieser Prozess gut in Experimenten im Labormaßstab untersucht werden (Li *et al.*, 2013; Mähler *et al.*, 2020; Sagemann *et al.*, 1999). Das Ausmaß der Mineralisierung kann dabei stark variieren, manche Fossilien zeigen lediglich einen dünnen Kristallfilm auf der Oberfläche, andere

1. Einleitung

sind als Versteinerungen eingelagert oder werden von Konkretionen umschlossen (Martill, 1990; McCoy, 2014; Orr *et al.*, 1998). Die Bildung von Konkretionen rund um das Gewebe kann die Präservierung von Weichgewebe vermutlich unterstützen (McCoy *et al.*, 2015). Es wird angenommen, dass die Mineralisierungsprozesse parallel zum Abbau des Gewebes und je nach Körperregion/-bereich unterschiedlich ablaufen können (Jauvion *et al.*, 2020; Wilby *et al.*, 1996).

1.1.1. Biomineralisierung

Der Begriff Biomineralisierung beschreibt einen direkten Einfluss biologischer Aktivität auf die Entstehung von Mineralien. Hierbei wird zwischen biologisch-kontrollierter (BCM) und biologisch-induzierter Mineralisierung (BIM) unterschieden (Lowenstam & Weiner, 1989; Weiner & Dove, 2003; Wilmeth *et al.*, 2018). Biologisch-kontrollierte Mineralisierung ist unter genetischer Kontrolle und erfüllt eine Funktion für den Organismus, der das Mineral präzipitiert. Typische Beispiele hierfür sind das Außen- und Innenskelett, wie Knochen oder Schalen, bei eukaryotischen Organismen (z.B. Muscheln oder Stachelhäuter). Es gibt kaum Beispiele für BCM bei prokaryotischen Organismen, bekannt sind hier nur die magnetotaktischen Bakterien. Die Individuen dieser bakteriellen Gruppe reichern kristalline, magnetische Strukturen, sogenannte Magnetosomen, im Cytoplasma an, die sich parallel zu den Kraftlinien des Magnetfeldes der Erde ausrichten (Bazylinski & Frankel, 2003; Faivre & Schüler, 2008; Li *et al.*, 2013). Der Großteil der Fossilfunde kann auf BCM zurückgeführt werden, da die Mineralien, wie Knochen oder Muscheln, deutlich resistenter gegen Abbau sind als Weichgewebe. Allerdings zeigen verschiedene Untersuchungen, dass biologisch-kontrollierte Mineralien ebenfalls die Präservierung von assoziiertem Weichgewebe verbessern können. Aus 3,8 Ma alten Straußeneiern konnten Proteine sequenziert werden, die vermutlich an die Oberfläche der Eier gebunden waren (Demarchi *et al.*, 2016), und selbst die sehr labile DNA wird durch eine Bindung an Hydroxyapatit stabilisiert (Brundin *et al.*, 2013).

Biologisch-induzierte Mineralisierung (BIM) ist nicht unter genetischer, aber unter metabolischer Kontrolle. Hier führt die Stoffwechselaktivität von Organismen, in den meisten Fällen die metabolische Aktivität von Bakterien, zu einer Veränderung der biochemischen Bedingungen in der Umgebung (z.B. pH-Wert), wodurch die Präzipitation von Mineralien begünstigt wird. So resultiert die Hydrolyse von Urea (Harnstoff) zu Ammonium und Carbamat durch bakterielle Ureasen in einem pH-Anstieg (Hammes *et al.*, 2003; Mobley & Hausinger, 1989). Dadurch wird Carbonat freigesetzt, was mit freien Calcium-Ionen zu Calciumcarbonat reagieren kann. Calcium-

1. Einleitung

Ionen binden sowohl an die negativ geladene Zellwand der Bakterien (Wilson *et al.*, 2001) als auch an die Oberfläche von Biofilmen, die je nach pH-Wert des umgebenden Mediums eine große Menge an sauren, funktionellen Gruppen aufweist. Kommt es zu einer Umstrukturieren oder dem Abbau dieser Strukturen werden die Ionen freigesetzt und können als Calciumcarbonat ausfallen (Arp *et al.*, 2003; Dupraz & Visscher, 2005; Hartley *et al.*, 1996). Neben den ureolytischen Bakterien hat auch die Aktivität von Sulfat-reduzierenden Organismen einen starken Einfluss auf den umgebenden pH-Wert. Die Reduktion von Sulfat zu Sulfid führt gleichzeitig zur Oxidation von organischem Kohlenstoff zu Bicarbonat, wodurch der pH-Wert ansteigt (Baumgartner *et al.*, 2006).

1.1.2. Organomineralisierung in Kombination mit biologisch induzierter Mineralisierung

Organomineralisierung beschreibt die Ausfällung von Mineralien aufgrund von organischer Materie, wie beispielsweise der extrazellulären, polymeren Substanz (EPS), die die Matrix eines Biofilms darstellt, oder von Nebenprodukten mikrobieller, metabolischer Prozesse. Ein typisches Beispiel für Organomineralisation im Fossilbericht sind Stromatoliten (Dupraz *et al.*, 2009), fossile mikrobielle Matten, die in Kapitel 1.2.1 ausführlicher beschrieben werden. Im natürlichen Umfeld laufen Organomineralisierung und BIM oftmals parallel oder nacheinander ab und können gemeinsam einen guten Erhalt unterstützen (Weiner & Dove, 2003; Wilmeth *et al.*, 2018). Zuerst führt mikrobielle Aktivität in und um einen Kadaver zu einer Übersättigung an freien Ionen (oder anderen biochemischen Veränderungen in der Umgebung; BIM), die dann an einem Kristallisationsnukleus, der oftmals durch den Abbau von organischem Material entsteht, ausfallen können (Organomineralisierung) (Li *et al.*, 2013; Reitner, 2004). Die vorhandenen Ionenkonzentrationen in der Umgebung können hierbei sowohl Einfluss auf die Art der Mineralien nehmen und steuern ob es zu einer Präzipitation kommt oder nicht. So kann eine Phosphat-reiche Umgebung die Phosphatisierung von Weichgewebe ermöglichen, was beispielsweise bei den Fossilfunden im Kalkstein von Cerin (Frankreich) zu einem guten Erhalt geführt hat. Damit Weichgewebe in Phosphat konserviert werden kann, wird neben Phosphat auch Calcium benötigt, was beides aus Porenwasser/(Meer)wasser absorbiert werden kann (Muscente *et al.*, 2015; Schiffbauer *et al.*, 2014). Zusätzlich dazu kann Phosphat auch durch den Abbau organischen Materials gewonnen werden (Allison & Briggs, 1991; Briggs & Kear, 1993c, 1994; Martill, 1990; Schiffbauer *et al.*, 2014; Wilby & Martill, 1992). Strukturen, die durch die Mineralisierung von Calciumphosphat erhalten wurden,

1. Einleitung

weisen mehr Details auf als Weichgewebe, das durch Calciumcarbonat präserviert wurde (Briggs & Wilby, 1996). Ob Calciumphosphat oder Calciumcarbonat gebildet wird, hängt im Wesentlichen vom pH-Wert der Umgebung ab („Calcium-Phosphat-Switch“, Schiffbauer *et al.*, 2014). Während bei einem neutralen pH (< 6,83) in der Anwesenheit von freien Calcium- und Phosphat-Ionen Calciumphosphat gebildet wird, fällt unter alkalischeren Bedingungen (pH > 6,83) Calciumcarbonat aus, sofern freie Calcium- und Carbonat-Ionen vorliegen (Briggs & Kear, 1993c, 1994; Briggs & Wilby, 1996; Burton & Walter, 1990). Briggs & Kear (1993c, 1994) konnten diese Beobachtung bei der Mineralisierung von Weichgewebe experimentell nachweisen. Solange Sauerstoff in den Versuchsaufbau diffundieren konnte, blieb der pH-Wert höher und Kristalle aus Calciumcarbonat (Mischung aus Aragonit und Kalzit) wurden präzipitiert. Im Gegensatz dazu führte ein Sauerstoffausschluss dazu, dass der pH deutlich saurer war und dadurch Calciumphosphat gebildet wurde. Mikrobieller Abbau von Weichgewebe führt zu Beginn meistens zu einer Erniedrigung des pH-Wertes, was oftmals eine Präzipitation von Phosphatverbindungen rund um den Kadaver zur Folge hat (Briggs & Wilby, 1996; Schiffbauer *et al.*, 2014). Auch verschiedene andere Studien unterstützen die Vermutung, dass der Abbau organischen Materials die Ausfällung von Calciumphosphat begünstigt (Habracken *et al.*, 2013; Heinemann *et al.*, 2011; Onuma *et al.*, 2000).

Im Hunsrückschiefer (Deutschland) findet sich ein weiteres Beispiel für eine Kombination aus BIM und Organomineralisierung in Form von gut erhaltenen, pyritisierten Fossilien. Die Präzipitation von Pyrit beruht auf einem Zusammenspiel von bakterieller Sulfat- und Eisenreduktion und auf einer mit Eisen angereicherten Umgebung. Die Aktivität von Sulfat-reduzierenden Bakterien führt zu einer großen Menge an Hydrogensulfid, was wiederum mit freien Eisen-Ionen reagieren kann. Über diagenetische Prozesse wird dann Pyrit (FeS₂) gebildet (Farrell, 2014). Damit ganze Gewebeteile pyritisiert werden können, muss eine sehr hohe Eisen-Konzentration im umliegenden Sediment vorliegen. Diese Annahme wird durch Gesteinsanalysen in bekannten Lagerstätten mit einem hohen Aufkommen an pyritisierten Fossilien bestätigt (Briggs *et al.*, 1996; Farrell *et al.*, 2013; Guan *et al.*, 2017; Raiswell, 1997). Bei niedrigen Eisen-Konzentrationen würde lediglich eine geringe Menge an Pyrit in das umgebende Sediment diffundieren und bei einem mittleren Eisenvorkommen würden sich Pyritbanden rund um den Kadaver ausbilden (Berner, 1969; Canfield & Raiswell, 1991; Coleman & Raiswell, 1993; Raiswell, 1993; Stockdale *et al.*, 2010), allerdings kein Gewebe in Pyrit präserviert werden.

Die Mehrzahl der natürlichen Carbonate ist vermutlich durch BIM aufgrund von mikrobieller Stoffwechselaktivität entstanden (Boquet *et al.*, 1973; Lin *et al.*, 2018). Bei der Präzipitation

von Carbonaten dient ebenfalls häufig das organische Material als Kristallisationsnukleus (Giuffrè *et al.*, 2013). Der Abbau des EPS aus einem Biofilm oder einer mikrobiellen Matte durch Sulfat-reduzierende Bakterien führt zu einer starken Freisetzung von Calcium-Ionen was eine Präzipitation von Calciumcarbonat begünstigen kann (Visscher *et al.*, 2000).

1.1.4. Mineralisierung von bakteriellen Zellen

Durch Mineralisierungsprozesse können auch die Mikroorganismen selber fossilisiert werden und ermöglichen so kleine Einblicke in die bakterielle Besiedelung der frühen Erdgeschichte. Neben mikroskopischen Analysen möglicher fossiler Bakterien (z.B. Preston *et al.*, 2011; Schopf, 1993; Wacey *et al.*, 2011), wurden in verschiedenen experimentellen Untersuchungen die Mineralisierungseigenschaften von unterschiedlichen Bakterienspezies *in vitro* (Boquet *et al.*, 1973; Braissant *et al.*, 2003; Daskalakis *et al.*, 2013; Hammes *et al.*, 2003; Hatayama & Saito, 2019; Kappler *et al.*, 2005; Phoenix *et al.*, 2003; Stocks-Fischer *et al.*, 1999; Warthmann *et al.*, 2000, 2005) und *in vivo* (Jones *et al.*, 2004) untersucht. Allerdings ist die Differenzierung von Mikrofossilien und abiotischen Artefakten sehr schwierig, wodurch die Interpretation von Mikrofossilien fehleranfällig ist (Braissant *et al.*, 2003; Brasier & Wacey, 2012; Li *et al.*, 2013; Rouillard *et al.*, 2018). Außerdem zeigen einige bakterielle Gruppen eine deutlich bessere oder ausgeprägtere Mineralisierung als andere, wodurch ebenfalls ein taxonomischer Bias in die Interpretation früherer Mikroorganismen eingeführt werden kann (Li *et al.*, 2013). Nur anhand von morphologischen Beobachtungen lassen sich abiogene und biogene Präzipitate kaum unterscheiden, weswegen Brasier & Wacey (2012) eine detaillierte Anleitung zur Analyse von Mikrofossilien verfasst haben. Weitere Studien beschäftigen sich ebenfalls experimentell mit der Bildung von Mikrofossilien und vergleichbaren abiogenen Präzipitaten, um die spezifischen Charakteristika zur Differenzierung herauszuarbeiten (Braissant *et al.*, 2003; Rouillard *et al.*, 2018). Und nicht nur abiotische Artefakte stellen ein Problem dar, auch andere biotische, kristalline Strukturen können morphologisch als Mikrofossilien interpretiert werden. So werden beispielsweise die Haftwurzeln des im Ediakarium weit verbreiteten Organismus *Aspidella* oftmals mit filamentösen Bakterien verwechselt (Grazhdankin & Gerdes, 2007; Laflamme *et al.*, 2011). Bei den meisten Strukturen, die bisher als Mikrofossilien eingeordnet wurden, handelt es sich vermutlich um fossile Melanosome. Da Melanosome eine vergleichbare Größe und Form wie Bakterien aufweisen, ist eine Differenzierung schwierig (McNamara *et al.*, 2016; Pinheiro *et al.*, 2019; Vinther *et al.*, 2008). Moderne

1. Einleitung

Labortechniken, wie RAMAN Spektroskopie, Nano-Sekundärionen-Massenspektrometrie, Raster-elektronenmikroskopie, Isotopen-Analyse oder eine Kombination der Methoden können die Analyse von Mikrofossilien verbessern (e.g. Schopf *et al.*, 2007; Wacey *et al.*, 2012; Bontognali *et al.*, 2012; Djokic *et al.*, 2017; Homann *et al.*, 2018). Auch geochemische Analysen von so genannten Biomarkern, wie Lipiden (Fettsäuren, Steroide), die deutlich stabiler sind als Peptide oder Nukleinsäuren, können interessante Einblicke in Stoffwechselwege oder die Phylogenie früherer Mikroorganismen geben (Brocks *et al.*, 2005; Brocks & Pearson, 2005). In Studien konnten so verschiedene bakterielle Stoffwechselwege, die zu einer Biomineralisierung geführt haben, identifiziert werden (Wiemann *et al.*, 2020). Andere Biomarker-Analysen weisen darauf hin, dass bestimmte fossile Carbonatschichten durch spezielle Archaea über die anaerobe Oxidation von Methan gebildet wurden (Stadnitskaia *et al.*, 2008).

1.2. Biofilm & Mikrobielle Matten

In vielen Habitaten kommen Bakterien oftmals nicht nur als frei lebende Einzelzeller vor (planktonische Lebensweise), sondern aggregieren gemeinsam mit anderen Bakterien an Grenzflächen zu einem Biofilm (sessile Lebensweise). Während wenige Mikroorganismen die planktonische Lebensweise bevorzugen, zeigen die meisten Bakterien zumindest unter bestimmten Bedingungen eine Adhäsion an Oberflächen. In marinen Habitaten gehören die Familien *Alteromonadaceae*, *Vibrionaceae* und *Bacteroidetes* zu den bekanntesten Vertretern der sessilen Lebensweise (Dang & Lovell, 2016). Die Bakteriengemeinschaft in einem Biofilm kann aus Mikroorganismen derselben Art bestehen, in den meisten Fällen lagern sich allerdings Bakterien unterschiedlichster Arten zusammen (O'Toole *et al.*, 2000; Sutherland, 2001b). Die sessile Lebensweise wird von den Bakterien teils zufällig, teils als Reaktion auf bestimmte Umweltbedingungen, wie beispielsweise das Nährstoffangebot, gewählt (Busscher *et al.*, 1992; Pratt & Kolter, 1998). Die Bakterien adhären an Oberflächen, vermehren sich bis zu einem bestimmten Grenzwert und starten dann die Expression spezieller Biosynthesegene, die die Synthese einer extrazellulären, polymeren Substanz (EPS) regulieren. Das EPS, das hauptsächlich aus Polysacchariden, Proteinen, Lipiden und extrazellulärer DNA besteht, umgibt die Zellen wie eine schleimige Matrix. Dies ermöglicht den Bakterien eine langfristige Adhäsion, stellt eine Schutzbarriere gegenüber chemischen Komponenten und abiotischen Faktoren, z.B. Austrocknung, dar und bietet den Bakterien einen idealen Lebensraum, in dem die Mikroorganismen über verschiedene Wege miteinander interagieren können

1. Einleitung

(Decho, 2000; Flemming & Wingender, 2010; Mah & O'Toole., 2001; O'Toole *et al.*, 2000; Roberson & Firestone, 1992). Zusätzliche dazu ermöglicht die Umlagerung mit einer Glykokalyx die Anreicherung von großen Mengen an Nährstoffen und vielfältigen Exoenzymen, die den Abbau organischen Materials katalysieren (Freeman *et al.*, 1995; Sinsabaugh *et al.*, 1991). Die genaue Zusammensetzung des EPS hängt stark von der mikrobiellen Zusammensetzung des Biofilms und anderen abiotischen und biotischen Faktoren, wie der Temperatur, dem Druck, hydrodynamischen Bedingungen und dem Nährstoffangebot, ab (Flemming & Wingender, 2010). Innerhalb der wässrigen Biofilm-Matrix können Ionen und andere Moleküle in hohen Konzentrationen angehäuft werden, was vermutlich durch ein Ungleichgewicht zwischen der starken Produktion der Substanzen und einem geringen Ausstrom aus der Matrix erklärt werden kann (Braissant *et al.*, 2009; Sutherland, 2001a). Dieser Umstand kann ebenfalls ausschlaggebend für die Mineralisierung von Biofilmen sein.

Mikrobielle Matten sind eine besonders komplexe Form eines Biofilms und werden von einer Bakteriengemeinschaft gebildet, die anhand von physikalischen Gradienten, wie pH, Osmolarität, Redoxpotential oder Sauerstoffsättigung, aufgeschichtet vorliegt (Arp *et al.*, 2012; Stewart & Franklin, 2008; Stolz, 2000; Visscher & van Gemerden, 1991). Es wird zwischen benthischen und frei schwebenden Matten unterschieden, wobei die benthischen Matten am Grund eines Sees vorzufinden sind und die frei schwebenden Matten ungebunden im Wasser vorkommen (Gall, 2001). Die bakterielle Zusammensetzung ist sehr divers und hängt hauptsächlich von den vorherrschenden Umweltbedingungen ab (Bonilla-Rosso *et al.*, 2012; Vasconcelos *et al.*, 2006). Meistens besteht das Mikrobiom einer mikrobiellen Matte aus verschiedenen Kombinationen aus Algen und Bakterien (Bolhuis & Stal, 2011; Cantrell & Duval-Perez, 2012; Freytet & Verrecchia, 1998), allerdings konnten auch schon Spezies aus den Domänen Archaea oder Eukarya identifiziert werden (Bolhuis *et al.*, 2013; Casamayor *et al.*, 2002; Robertson *et al.*, 2009). Die Dicke einer mikrobiellen Matte variiert von wenigen Millimetern bis zu mehreren Zentimetern und auch die Schichtung der einzelnen Mikroorganismen ist sehr verschieden (Prieto-Barajas *et al.*, 2018). Es gibt nur wenige Beispiele für mikrobielle Matten, die unter gemäßigten Bedingungen, z.B. an der Nordsee, wachsen (Bolhuis *et al.*, 2013; Freytet & Verrecchia, 1998; Stal *et al.*, 1985). Meist bilden sich die Matten eher an extremen Standorten, wie hypersalinen (Braissant *et al.*, 2009; Guerrero & de Wit, 1992; Ionescu *et al.*, 2015; Schneider *et al.*, 2013), alkalischen (Arp *et al.*, 2003), extrem heißen (Klatt *et al.*, 2013) oder antarktischen Seen (Ohtsuka *et al.*, 2006). Dieser Umstand kann durch die

1. Einleitung

Abwesenheit von grasenden Organismen an diesen extremen Habitaten erklärt werden (Briggs, 2003; Gall, 2001).

1.2.1. Biofilme, mikrobielle Matten und Fossilisierung

Die Mineralisierung von mikrobiellen Matten ist ein langwieriger Prozess, der bis zu mehrere Jahre dauern kann. Hierfür spielen verschiedene Faktoren eine Rolle. Sowohl abiotische Bedingungen, wie das Calcium-Carbonat-Gleichgewicht im umgebenden Medium, als auch biotische Faktoren, wie die mikrobielle Aktivität und pH-Veränderungen durch Stoffwechselprodukte der Bakterien, können die Mineralisierung beeinflussen (Vasconcelos *et al.*, 2006; Wilmeth *et al.*, 2018). Zusätzlich zu der mikrobiellen Aktivität hat auch das EPS selbst einen großen Einfluss auf die Mineralisierung einer mikrobiellen Matte. Zum einen steuert die EPS-Matrix die Morphologie und Mineralogie der Präzipitate (Braissant *et al.*, 2003) und zum anderen kontrolliert sie die Mineralisierung durch die Fixierung von Ionen aus der Umgebung (Dupraz *et al.*, 2009). Da das EPS eine große Menge an negativ geladenen funktionellen Gruppen aufweist, hat es eine hohe Bindungskapazität für Kationen (z.B. Ca^{2+} oder Mg^{2+}) aus der umliegenden Umgebung. Sind alle Kationen gebunden, kann keine Mineralisierung stattfinden, eine Präzipitation ist dadurch inhibiert (Dupraz & Visscher, 2005). Wird die Bindungskapazität des EPS aktiv oder passiv verändert, fungiert das EPS dagegen als Induktor der Mineralisierungsreaktion. Dazu wird entweder das EPS durch mikrobielle Aktivität, z.B. durch Sulfat-reduzierende Bakterien, ab- und umgebaut (Decho *et al.*, 2005), sodass die Bindung der Kationen mit den funktionellen Gruppen aufgehoben wird, oder eine Übersättigung der Umgebung (extrinsisch oder intrinsisch durch sterische Nischenbildung) führt zu frei vorliegenden Kationen (Dupraz *et al.*, 2009; Dupraz & Visscher, 2005).

Ein bekanntes Beispiel für einen mineralisierten Biofilm ist Zahnstein. In der Mundhöhle adhären unterschiedliche Bakterien (Gram-positiv, Gram-negativ, aerob, anaerob) auf der Oberfläche des Zahnschmelzes und bilden eine Biofilm-Matrix aus (Jin & Yip, 2002; White, 1997). Aus dem Speichel oder aus der Zahnfleischtaschenflüssigkeit absorbiert Calcium und Phosphat in den Biofilm. Durch bestimmte Stoffwechselaktivitäten der Bakterien, wie dem Abbau von Zuckern, werden Säuren freigesetzt, was zu einem erniedrigten pH-Wert und daraus resultierend einer Demineralisierung des Zahnschmelzes führt. Innerhalb des Biofilms, der als semipermeable Barriere fungiert, entsteht so eine Übersättigung an Ionen (Braissant *et al.*, 2009; Sutherland, 2001a). Diese Übersättigung kann eine Ausfällung von Calciumphosphat zur Folge haben, was die Grundlage für

1. Einleitung

den Zahnstein darstellt (Marsh, 2006; Nancollas & Johnsson, 1994). Ein ähnliches Phänomen kann in Blasenkathetern zu einem Problem werden. Durch die ureolytische Aktivität von Bakterien kommt es zur Kristallisierung und damit zur Verstopfung des Katheters (Stickler, 2008).

Sobald ein toter Organismus auf den Boden sinkt, kann er schnell von einer mikrobiellen Matte überwachsen werden. Dadurch scheinen Abbau- und Zerfallsprozesse verlangsamt abzulaufen (Briggs, 2003; Iniesto, 2016). Außerdem verhindert die Überwachsung mit einer mikrobiellen Matte, dass potentielle Räuber oder Bioturbation den Korpus zerstören oder aufwirbeln. Durch den Einschluss in die Biofilm-Matrix werden die umgebenden Bedingungen verändert (z.B. pH-Veränderung, Sauerstoffverlust/Anoxia, hohe S^{2-} Konzentrationen), sodass andere Prozesse, wie z.B. die Präzipitation von Mineralien, ablaufen. Bei vielen Fossilien, die in die Zeit des Ediakariums datiert werden konnten, wird vermutet, dass ihr besonders guter Erhalt auf die Mineralisierung mikrobieller Matten zurückgeführt werden kann. Eine Hypothese („Death mask“-Modell), die 1999 von Gehling aufgestellt wurde, beschreibt, dass tote Organismen relativ schnell auf das Sediment abgesunken und dort innerhalb kürzester Zeit von mikrobiellen Matten überwuchert wurden. Mikrobielle Matten waren in dieser Zeitperiode stark verbreitet und konnten den Kadaver vor räuberischen Fressfeinden oder Verwirbelung durch Wasserschichten schützen und luftdicht abschließen, was die bakterielle Aktivität und damit die Zersetzung des Organismus verringern konnte (Briggs, 2003; Gehling, 1999; Iniesto *et al.*, 2016). Durch diesen Umstand änderten sich die abiotischen Bedingungen, wie pH, Sauerstoff oder Konzentration an Ionen, innerhalb der mikrobiellen Matte stark und das Wachstum strikt anaerober Bakterien wurde begünstigt. Sulfat-reduzierende Bakterien konnten Sulfat zu Sulfid reduzieren, was dann mit freien Eisen-Ionen aus dem Sediment zu Pyrit reagieren konnte (Droser *et al.*, 2006; Gehling *et al.*, 1999, 2005). Das umliegende Sediment wurde durch die mikrobielle Matte in Kombination mit einer starken authigenen Mineralisierung stabilisiert und konnte den Kadaver dadurch abbilden (Gehling, 1999; Kenchington *et al.*, 2015).

Im Fossilbericht werden vor allem Biofilme aus hydrothermalen Habitaten erwähnt (Braissant *et al.*, 2003; O'Brien *et al.*, 2008; Pinheiro *et al.*, 2012; Trewin & Knoll, 1999; Westall, 1999). Gut erhaltene fossile mikrobielle Matten liegen meist in der Form von Stromatoliten vor (Reitner, 2011) und konnten in verschiedensten Lagerstätten auf der Erde, wie z.B. in Europa (Grès à Voltzia, Las Hoyas Formation, Buscalioni & Frenegal-Martínez, 2010), Australien (Warrawoona Gruppe, Bontognali *et al.*, 2012; Djokic *et al.*, 2017; Duda *et al.*, 2016; Rasmussen, 2000), Südafrika (Baberton Greenstone Belt, Hickman-Lewis *et al.*, 2018; Homann *et al.*, 2018; Westall *et al.*,

1. Einleitung

2001) oder Amerika (Wheeler Formation, Gaines *et al.*, 2005) beschrieben werden. Eine Präservierung von Weichgewebe durch den Einfluss mikrobieller Matten wurde auch in einigen experimentellen Ansätzen untersucht (Briggs & Kear, 1994; Brock *et al.*, 2006; Hof & Briggs, 1997; Martin *et al.*, 2004; Briggs & Kear, 1994; Butler *et al.*, 2015; Darroch *et al.*, 2012; Iniesto *et al.*, 2013, 2017; Raff *et al.*, 2014; Raff & Raff, 2014).

1.3. 16S-rRNA-Amplikon-Analyse

Die Identifizierung bakterieller Spezies erfolgt seit über 30 Jahren über das spezielle „Housekeeping“ Gen, die 16S-rRNA-Gensequenz (Lane *et al.*, 1985; Woese & Fox, 1977). Die 16S ist die kleine Untereinheit der Ribosomen und kommt ubiquitär in allen Bakterien und Archaeen vor (Morgan & Huttenhower, 2012), die ihre messenger RNA (mRNA) über ein ribosomales System translatieren (Kembel *et al.*, 2012). Die Gensequenz besteht aus mehreren funktionellen Domänen und ist mit ungefähr 1500 bp lang genug, um statistisch relevante Informationen zu liefern. Bereiche, die aus vielen verschiedenen Domänen bestehen, sind weniger anfällig für Fehlinterpretationen durch Mutationen in den einzelnen Domänen, da sich lediglich ein Abschnitt verändert, dies jedoch keine Auswirkungen auf die restliche Sequenz hat (Patel, 2001). Wie in Abbildung 2 dargestellt, besteht die 16S-rRNA-Gensequenz aus hoch konservierten und neun hypervariablen Regionen (V1-V9).

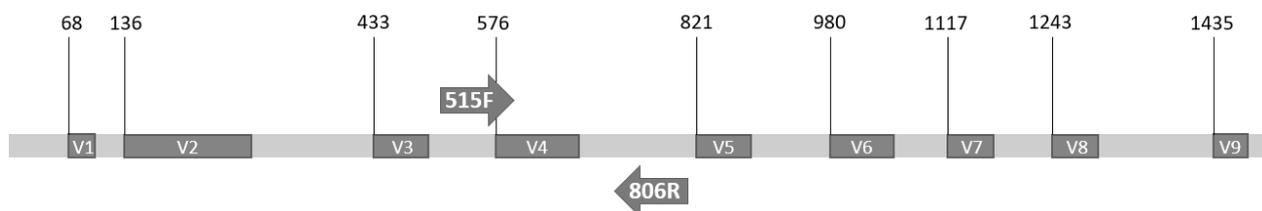


Abbildung 2: Schematische Darstellung der 16S-rRNA-Genregion von Bakterien. Die Gensequenz ist aus mehreren konservierten und neun hypervariablen Regionen zusammengesetzt. Der besondere Aufbau ermöglicht die Typisierung von Bakterien, da die universellen Primer die hypervariablen Bereiche umschließend und die Sequenzen oftmals charakteristisch für bakterielle Genera und Spezies sind.

Die konservierten Bereiche können genutzt werden, um universelle, degenerierte Primer zu designen, die die hypervariablen Regionen einrahmen. Anhand dieser einzigartigen Abschnitte können die Bakterien dann identifiziert werden (Claesson *et al.*, 2010; Neefs *et al.*, 1993). Die Wahl der Primer und damit die Analyse der hypervariablen Bereiche können die Fehleranfälligkeit der taxonomischen Zuordnung stark beeinflussen (Kuczynski *et al.*, 2012; Martinez-Porchas *et al.*, 2017).

1. Einleitung

Die Regionen V1-V3, V4 oder V4-V5 haben sich in der Analyse von Bakterien etabliert, da hier die meisten Genus-Level-Unterschiede detektiert werden können (Kim *et al.*, 2011). Die sequenzierten 16S-rRNA-Gensequenzen können dann mit großen Datenbanken, wie SILVA (Pruesse *et al.*, 2007), Greengenes (DeSantis *et al.*, 2006) oder NCBI BLAST® (www.ncbi.nlm.nih.gov) abgeglichen und dadurch taxonomisch zugeordnet werden. Moderne Hochdurchsatz-Methoden, wie Next Generation Sequencing, ermöglichen heutzutage die Analyse ganzer Ökosysteme und die Identifizierung der dort vorgefundenen Mikroorganismen. Neben der 16S-rRNA-Gensequenz existieren ebenfalls Methoden zur Einordnung von Pilzen, die 18S-rRNA-Gensequenz oder die ITS („internal transcribed spacer“-)Region, oder anderen Eukaryoten.

1.4. Ziel der Arbeit

In diesem Projekt sollten artifizielle Zerfallsexperimente unter unterschiedlichen abiotischen Bedingungen durchgeführt werden. Hochdurchsatz 16S-rRNA-Amplikon-Sequenzierungen ermöglichen eine Analyse der bakteriellen Besiedelung in einer Probe und damit die Detektion von Änderungen in der Zusammensetzung des Mikrobioms. Während sich die wenigen bakteriellen Untersuchungen in der paläontologischen Wissenschaft auf einzelne Organismen oder das Zusammenspiel zwischen wenigen Bakterien (Eagan *et al.*, 2017; Raff *et al.*, 2008, 2013; Raff *et al.*, 2014) konzentriert haben, sollten in diesem Ansatz die vielfältigen und komplexen, mikrobiellen Interaktionen im Detail beobachtet werden. Parallel dazu wurden die taphonomischen Veränderungen des Weichgewebes und die geochemischen Anpassungen in der Umgebung untersucht (vgl. Mähler, 2021) und mit den 16S-rRNA-Amplikon-Analysen verglichen. Dieses Vorgehen sollte essentielle, offene Fragen zum bakteriellen Einfluss auf Zerfalls- oder Erhaltungsprozesse klären.

- 1) Welche Rolle spielen Bakterien bei der Fossilisation? Wie wichtig ist die bakterielle Aktivität, damit ein Fossil entstehen kann?
- 2) Welche Bakterien haben den größten Einfluss auf abbauende oder erhaltende Prozesse?
- 3) Woher stammen diese Bakterien? Gelangen sie aus der Umgebung (extrinsisch) zum Kadaver oder sind sie Teil der intrinsischen Körperflora des Organismus?
- 4) Welche Stoffwechselwege oder bakteriellen Eigenschaften beeinflussen die Prozesse (am meisten)?

1. Einleitung

- 5) Inwiefern verändern abiotische Faktoren die bakterielle Aktivität und wodurch kann der Erhalt von Weichgewebe diesbezüglich gesteuert werden?

Zur Klärung dieser Fragen wurden acht verschiedene Zerfallsexperimente geplant. Zum einen sollten zwei verschiedene Temperaturen (4 °C und 24 °C) getestet werden. Neben der Umgebungstemperatur wurde ebenfalls der Sauerstoffgehalt angepasst (aerobe und anaerobe Startbedingungen). Der Einfluss der Sauerstoffverfügbarkeit auf die Zersetzung von Weichgewebe wurde in verschiedenen Experimenten unter Laborbedingungen getestet, jedoch bisher ohne eindeutiges Ergebnis. Die Herkunft der Bakterien, die möglicherweise den Abbau oder die Präservierung des Weichgewebes steuern, ist ebenfalls nahezu unbekannt. Neben der intrinsischen Flora (Gastrointestinaltrakt, Haut), können auch extrinsische Bakterien aus der näheren Umgebung (Wasser, Sediment, Pflanzen) die Zerfalls- und Erhaltungsprozesse beeinflussen. Zu diesem Zweck wurde in vier Versuchsreihen (Versuchsreihe 2, 4, 6, 8) das verwendete Seewasser im Vorfeld autoklaviert, um die extrinsische Flora ausschließen zu können.

Zusätzlich dazu sollten Bakterien auf unterschiedlichen Nährmedien während der Versuchsreihen isoliert und auf ihre speziellen Eigenschaften untersucht werden. Dieses Vorgehen sollte einerseits weitere Einblicke in die komplexen Vorgänge und die metabolische Aktivität der Zerfalls- und Präservierungsprozesse geben. Andererseits sollen die Isolate ebenfalls für zukünftige, kontrollierte Zerfallsexperimente mit sterilem Weichgewebe genutzt werden.

2. Material und Methoden

2.1. Verwendete Chemikalien & Materialien

Tabelle 1: Übersicht über die verwendeten Chemikalien mit Herstellerangaben.

Chemikalie	Hersteller
α -Cyano-4-Hydroxy-Zimtsäure	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Acetonitril	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Agar	Oxoid Deutschland GmbH, Wesel, DE
Agarose Universal	Bio-Budget Technologies GmbH, Krefeld, DE
Ampuwa® Wasser (DNase- & RNase-frei)	Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg, DE
Bacto-Pepton	Difco Laboratories Ltd, Detroit, USA
Bacto™ Trypton	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Bovines Serumalbumin (BSA)	New England Biolabs, Frankfurt, DE
$\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \times \text{H}_2\text{O}$	Merck KGaA, Darmstadt, DE
$\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Casamino Acids	Difco Laboratories Ltd, Detroit, USA
Ciprofloxacin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
COL-S-Blutagar	BD Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, USA
DNase I (1 U/ μl)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
enzymatisch abgebautes Sojaprotein	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Essigsäure	Carl Roth GmbH & Co. KG, Darmstadt, DE
Ethanol (> 99 % Reinheit)	AppliChem GmbH, Darmstadt, DE
GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Glucose	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Glycerin	AppliChem GmbH, Darmstadt, DE
Harnstoff (Urea)	Merck KGaA, Darmstadt, DE
HCl	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Hefeextrakt LP0021 ??	Oxoid Deutschland GmbH, DE
HF-Puffer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
KCl	Merck KGaA, Darmstadt, DE
KH_2PO_4	Merck KGaA, Darmstadt, DE
$\text{KH}_2\text{PO}_4 \times 3 \text{H}_2\text{O}$	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Krabbenchitin (> 95 % Acetylierungsgrad)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Kristallviolett	Merck KGaA, Darmstadt, DE
MacConkey-Agar	BD Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, USA
Magermilchpulver	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Magnesiumchlorid (MgCl_2)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
MgSO_4	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Midori ^{Green} Direct	Nippon Genetics Europe, Düren, DE
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	Merck KGaA, Darmstadt, DE
NaCl	Carl Roth GmbH & Co. KG, Darmstadt, DE
Natriumdihydrogenphosphat (NaH_2PO_4)	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Nucleotide (dNTPs)	Fermentas, St. Leon-Rot, DE
Olivenöl	Gut & Günstig, Edeka-Gruppe, DE

2. Material und Methoden

OneTaq® 2X Master Mix	New England Biolabs GmbH, Frankfurt, DE
Phenolrot	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Phusion™ High Fidelity DNA Polymerase	Finnzymes, sales: NEB, Frankfurt, DE
Protection Reagent	New England Biolabs GmbH, Frankfurt, DE
Quick-Load® Purple 100 bp/1kb+ DNA ladder	New England Biolabs GmbH, Frankfurt, DE
R-2A-Agar	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Random Hexamers	New England Biolabs GmbH, Frankfurt, DE
Rhodamin B	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Tetrazyklin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Trypton	Oxoid Deutschland GmbH, Wesel, DE
TSB	Oxoid Deutschland GmbH, Wesel, DE
ZymoBIOMICS Microbial Community Standard (D6300)	Zymo Research, Irvine, USA
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Isopropanol (2-Propanol)	AppliChem GmbH, Darmstadt, DE

2.2. Verwendete Kits

Tabelle 2: Übersicht über die verwendeten Kits mit Herstellerangaben.

Kit	Hersteller
DNeasy® Blood & Tissue Kit	Qiagen GmbH, Hilden, DE
DNeasy® UltraClean® Microbial Kit	Qiagen GmbH, Hilden, DE
GeneJet Gelextraction Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
GeneJet PCR Purification Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Monarch RNA Miniprep Kit	New England Biolabs GmbH, Frankfurt, DE
ZymoBIOMICS™ DNA Miniprep Kit	Zymo Research, Irvine, USA
LunaScript® RT SuperMix Kit	New England Biolabs GmbH, Frankfurt, DE

2.3. Verwendete Software

Tabelle 3: Übersicht über die verwendete Software und Programme mit der entsprechenden Internetseite.

Computerprogramm	Internetseite
BugBase	https://bugbase.cs.umn.edu/
EZBioCloud Database	https://www.ezbiocloud.net/
Geneious 10.2.3	https://www.geneious.com/
NCBI Blast	https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi
QIIME2	https://qiime2.org/
R (version 4.0.5)	https://cran.r-project.org/bin/windows/
RStudio Desktop 1.4.1717	https://www.rstudio.com/products/rstudio/download/
Sequence massager	http://www.attotron.com/cybertory/analysis/seqMassager.htm

2.4. Verwendete Geräte und Verbrauchsmaterialien

Tabelle 4: Übersicht über die verwendeten Geräte und Verbrauchsmaterialien mit Herstellerangaben.

Gerät/Verbrauchsmaterial	Hersteller
96-Well-Platte	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Adapter Vortex-Genie 2 Vortex	Qiagen GmbH, Hilden, DE
Aerodisc® Syringe Filter (0,2 µm)	Pall Corporation, New York, USA
Agarosegelelektrophorese-Kammer	Peqlab Biotechnology GmbH, Erlangen, DE
Analysewaage	Ohaus Corporation, Parsippany, USA
BD Difco™ GasPak™ Anaerob Indikator	BD Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, USA
BD Difco™ GasPak™ EZ Anaerob System	BD Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, USA
BD Difco™ GasPak™ EZ Anaerobier Pouch System	BD Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, USA
Bead Beating Gefäß	Bertin Technologies SAS, Montigny-le-Bretonneux, FR
Bottletopfilter (Stericup Millipore Express ca. no. SCG-PU02RE)	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Brutschrank B6060 / B6	Heraeus, Hanau, DE
Eismaschine UBE 3-10	Ziegra Eismaschinen GmbH, Isernhagen, DE
Eppendorf-Reaktionsgefäß (1,5 ml; 2 ml)	Eppendorf, AG, Hamburg, DE
Erlenmeyerkolben	Schott, Mainz, DE
Falcon Reaktionsgefäße (15 ml, 50 ml)	Greiner Bio-One, Kremsmünster, AT
Faltenfilter, qualitativ, 595 1/2	Whatman plc, Maidstone, GB
FastGene® FAS-DIGI UV Imager	Nippon Genetics Europe, Düren, DE
Gefrierschrank (-70°C)	Heraeus, Hanau, DE
Gefrierschrank (comfort)	Liebherr, Kirchdorf an der Iller, DE
Gefrierschrank HFU (-70 °C)	Heraeus, Hanau, DE
Glasbeads 0,1 mm	Carl Roth GmbH & Co. KG, Darmstadt, DE
Horiba LabRAM HR Evolution Raman Spektrometer	Horiba, Kyōto, JPN
Inkubationsschüttler (Infors HT Ecotron)	Infors HAT GmbH, Bottmingen, CH
Keramikbeads 2,8 mm	Bertin Technologies SAS, Montigny-le-Bretonneux, FR
Küvetten	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, DE
Magnetrührer mit Heizplatte (RCT classic IKA-MAG®)	IKA®-Werke GmbH & Co KG, Staufen im Breisgau, DE
Microflex® LT MALDI-TOF/MS	Bruker Corporation, Billerica, USA
Mikrovolumen-UV/VIS-Spektralphotometer Nano-Drop™ One ^C	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Nalgene® Kryoröhrchen	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Netze	Brema Fliegengitter (Nr. 895464)
Olympus BX-FM Mikroskop	Olympus K.K., Shinjuku, JPN
Parafilm	witeg Labortechnik GmbH, Wertheim, DE
PCR-Cycler Biometra T Gradient	Biometra GmbH, Göttingen, DE
pH-Meter (pH5222)	WTW, DE
Plattenleser Infinite M Plex	Tecan, Männedorf, CH
PORA NC Einmalfilter (0,22 µm)	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, DE
Präzisionswaage	Kern & Sohn Waagen, Balingen, DE
Precellys Tissue Homogenizer	Bertin Technologies SAS, Montigny-le-Bretonneux, FR
Reagenzgläser	Schott, Mainz, DE

2. Material und Methoden

Reagenzschüttler (RS-VA 10)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, DE
Schott-Flaschen	Schott, Mainz, DE
Schott-Flaschen	Schott, Mainz, DE
Spannungsquelle (Electrophoresis Powersupply)	Renner GmbH, Krefeld, DE
Spektrophotometer (UviLine 9400)	Schott Instruments GmbH, Mainz, DE
Sterilfilter FP 30/0.45 (0,45 µm)	Whatman plc, Maidstone, GB
Tischzentrifuge (Sigma 1-14 K)	Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode, DE
Ultrazentrifuge (Sorvall Discovery MI120SE)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
UV-Transilluminator Chroma 43	Vetter GmbH, Wiesloch, DE
Vortexer (MS 2 Minishaker)	Invitrogen AG, Waltham, DE
Wasseraufbereitungssystem (MilliQ® Biocel System A10)	Merck Millipore, Burlington, USA
Zentrifuge (Multifuge 1 S-R)	Heraeus, Hanau, DE

2.5. Medien und Puffer

Spezielle Medien zur Anzucht und zur Charakterisierung von Bakterien sind im passenden Abschnitt beschrieben. Bei der Verwendung von Festmedium wurden 18 g/l Agar vor dem Autoklavieren hinzugegeben.

Tabelle 5: Übersicht über die verwendeten Medien.

LB-Medium	10 g/l Bacto™Trypton, 10 g/l NaCl, 5 g/l Hefeextrakt in dH ₂ O (pH 7,5)
10X TAE Puffer	48,46 g/l Tris (0,4 M), 3,72 g/l EDTA-Na ₂ -Salz (0,01 M), 12,01 g/l Essigsäure (0,2 M)
BHI-Medium (angesetzt von der Nährbodenküche)	8 g/l Hirn-Herz-Infus, 5 g/l peptisch abgebautes Tiergewebe, 16 g/l pankreatisch abgebautes Casein, 5 g/l NaCl, 2 g/l Glucose, 2,5 g/l Na ₂ HPO ₄ (pH 7,4 ± 0,2)
Columbia Blutagar mit 5 % Schafblut	BD™ (Becton, Dickinson and Company, New Jersey, USA)
MacConkey Agar	BD™ (Becton, Dickinson and Company, New Jersey, USA)
MH-Medium (angesetzt von der Nährbodenküche)	300 g/l Rindfleischauflösung, 17,5 g/l hydrolysiertes Casein, 1,5 g/l Stärke in dH ₂ O (pH 7,3 ± 0,2)
Minimal-LB-Medium	5 g/l Bacto™Trypton, 5 g/l NaCl, 2,5 g/l Hefeextrakt in dH ₂ O (pH 7,5)
PBS	8 g/l NaCl, 0,2 g/l KCl, 1,44 g/l KH ₂ PO ₄ , 1,8 g/l Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O in dH ₂ O (pH 7,4)

2. Material und Methoden

R-2A-Agar	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
TSB-Medium	15 g/l pankreatisch abgebautes Casein, 5 g/l enzymatisch abgebautes Sojaprotein, 5 g/l NaCl in dH ₂ O (pH 7,3)

2.6. Grundlagen der Molekularbiologie

2.6.1. Stammhaltung und allgemeine Vorgehensweisen

Die Bakterienstämme, die in dieser Arbeit isoliert werden konnten, wurden als Dauerkultur für die Stammsammlung der AG Bierbaum angelegt. Dafür wurden spezielle Kryogefäße (Nalgene® Kryoröhrchen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) mit einer Mischung aus MH und 100 % Glycerin vorbereitet. Die bakteriellen Reinkulturen konnten direkt von der Platte mit einem sterilen Tupfer abgenommen und in die Kryogefäße eingerührt werden. Anschließend wurde das Gemisch für 30 s gevortext und dann bei - 80 °C dauerhaft gelagert. Zur Kultivierung der Mikroorganismen wurden die Stämme auf entsprechende Nähragarplatten ausgestrichen und je nach Ansprüchen inkubiert.

Zur Ermittlung der Zellzahl in Flüssigkulturen wurde näherungsweise die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm (OD_{600}) mithilfe eines Spektral-Photometers UviLine 9400 (Schott Instruments GmbH, Mainz, DE) bestimmt. Bei Messwerten über 0,4 wurde die Zellsuspension verdünnt. Zur Sterilisation wurden alle Medien, Chemikalien und Pipettenspitzen bei 121 °C für 20 min autoklaviert. Die Glasmaterialien, wie Erlenmeyerkolben und Messzylinder, wurden für 4 h bei 200 °C sterilisiert. Hitzeinstabile Lösungen wurden zur Vermeidung von Kontaminationen über Aerodisc® Syringe Filter mit einer Porengröße von 0,2 µm (Pall Corporation, New York, USA) gefiltert.

2.6.2. Messung der DNA- und RNA-Konzentration

Zur Bestimmung der DNA- und RNA-Konzentrationen wurde das Mikrovolumen-UV/VIS-Spektrophotometer NanoDrop™ One^C (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) verwendet. Die Konzentrationen wurden bei einer Wellenlänge von 260 nm ermittelt. Die Reinheit der Probe kann

anhand des Verhältnisses der Absorption bei 260 nm und 280 nm, und 260 nm und 230 nm beschrieben werden. Der Wert sollte in beiden Fällen zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

2.6.3. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) der 16S-rRNA-Fragmente

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) dient der Amplifikation von DNA-Fragmenten (Mullis *et al.*, 1986). Die Länge und die Spezifität der Fragmente wird über kurze, einzelsträngige Oligonukleotide, so genannte Primer, definiert. Der Ablauf der PCR-Reaktion gliedert sich in drei essentielle Abschnitte. Zu Beginn muss die eingesetzte DNA-Matrize durch einen 3-minütigen Erhitzungsschritt auf 95 °C denaturiert werden (Initiale Denaturierung). Hierbei wird ebenfalls ein verfrühtes Binden der Primer verhindert. Anschließend erfolgen drei Schritte, die in einer festgelegten Zyklenanzahl wiederholt werden. Nach einer erneuten Denaturierung für 1 min bei 95 °C, wird die Temperatur erniedrigt und die Primer können an die einzelsträngige DNA binden (Annealing). Die Temperatur ist für jeden Primer spezifisch. Ausgehend von den gebundenen Primern kann dann die DNA-Polymerase den komplementären Strang in 5'-3'-Richtung synthetisieren (Extension). Die Temperatur bei der Elongation hängt von der ausgewählten, hitzestabilen Polymerase ab. Am Ende jedes PCR-Laufs erfolgt eine finale Elongation für einige Minuten, um eine vollständige Synthese aller Fragmente garantieren zu können. Bei der 16S-rRNA-PCR werden zwei verschiedene Zyklen durchgeführt, da die verwendeten Primer unspezifischer sind und möglichst an alle gewünschten Bereiche binden sollen. In Tabelle 6 sind die in diesem Projekt verwendeten Primer und in Tabelle 7 die Zusammensetzung der PCR-Ansätze und die PCR-Programme aufgeführt.

Tabelle 6: Übersicht über die verwendeten Primer. Bei den Primern, die zur Amplifikation der 16S-rRNA-Gensequenz genutzt werden, sind spezielle Mischbasen (engl. wobble bases) eingefügt, die aufgrund ihrer Struktur an variable Basen binden können (M = C/A, Y = C/T).

Name	16S-Orientierung	Sequenz (5' - 3')	Quelle
GM3F	8F	AGA GTT TGA TCM TGG C	Muyzer <i>et al.</i> , 1995
27F	27F	AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG	Lane, 1991
1492R	1492R	GGY TAC CTT GTT ACG ACT T	basierend auf Turner <i>et al.</i> , 1999
GM4R	1507R	TAC CTT GTT ACG ACT T	Muyzer <i>et al.</i> , 1995
GM8neu	798R	GGA CTA CCA GGG TAT CTA AT	Buchholz-Cleven <i>et al.</i> , 1997
GM1F	518-534F	CCA GCA GCC GCG GTA AT	Buchholz-Cleven <i>et al.</i> , 1997
1114F Stahl	1114F	GCA ACG AGC GCA ACC C	Buchholz-Cleven <i>et al.</i> , 1997

2. Material und Methoden

Tabelle 7: Zusammensetzung der PCR-Ansätze und Übersicht über die PCR-Programme, sowohl für die Verwendung einer Phusion-Polymerase, als auch eines OneTaq® 2X Master Mix.

OneTaq®-PCR		Phusion-PCR	
OneTaq 2x MasterMix	12,5 µl	HF-Puffer	10 µl
		dNTPs (10 mM)	1 µl
		Phusion-Polymerase	0,5 µl
Primer_for	0,5 µl	Primer_for (10 mM)	1 µl
Primer_rev	0,5 µl	Primer_rev (10 mM)	1 µl
DNA	~ 100 ng	DNA	~ 100 ng
PCR-H ₂ O	ad. 25 µl	PCR-H ₂ O	ad. 50 µl

PCR-Programm 16S-rRNA Gensequenz			
OneTaq®	Phusion		
95 °C	95 °C	3 min	
95 °C	95 °C	1 min	
49 °C	49 °C	1 min	10 x
68 °C	72 °C	1,5 min	
95 °C	95 °C	1 min	
44 °C	44 °C	1 min	20 x
68 °C	72 °C	1,5 min	
68 °C	72 °C	5 min	
4 °C	4 °C	∞	

2.6.3.1. Kolonie-PCR

Eine Variante der PCR ist die Kolonie-PCR, bei der Zellmaterial direkt von einer gewachsenen Kolonie oder einer Flüssigkultur im PCR-Ansatz resuspendiert wird. Das PCR-Programm wird durch einen zusätzlichen Erhitzungsschritt auf 95 °C für 5 min ergänzt, um die Zellen aufzuschließen und die DNA freizusetzen. Bei manchen Bakterien muss dieser Erhitzungsschritt verlängert werden. Dafür wird das Probenmaterial zuerst in 80 µl Ampuwa® Wasser (Fresenius Kabi Deutschland GmbH, DE) gelöst und anschließend durch einen 10-minütigen Hitzeschritt aufgeschlossen. Nach der Zentrifugation für 5 min bei 11.000 x g liegt die DNA im Überstand vor und kann direkt in die PCR eingesetzt werden. Bei dieser unsauberen Form der DNA-Isolation kann durch die Zugabe von 1 µl Bovines Serum Albumin (BSA, New England Biolabs, Frankfurt, DE), einem Blutplasma protein, eine Inhibition der PCR-Reaktion verringert werden (Farell & Alexandre, 2012; Sidstedt *et al.*, 2019).

2.6.4. Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese wird im Anschluss an die PCR durchgeführt, um die Amplifikation der DNA-Fragmente zu überprüfen. Die verwendete Agarose bildet durch Quervernetzungen eine Siebstruktur aus, die die DNA-Fragmente bezogen auf ihre Größe unterschiedlich schnell durchwandern. Da die DNA aufgrund ihres Phosphatrückgrades negativ geladen ist, bewegt sie sich kontinuierlich in Richtung der Anode. Zusätzlich zu den Proben wird ein DNA-Marker mit Fragmenten bekannter Größe aufgetragen, um eine Zuordnung der Größe der Fragmente zu ermöglichen. In diesem Projekt wurden 1%ige Agarosegele verwendet, die in 1 x TAE-Puffer angesetzt wurden. Die Proben wurden in einem Verhältnis von fünf zu eins mit dem Nukleinsäurefarbstoff Midori^{Green} Direct (Nippon Genetics Europe, Düren, DE) versetzt, was eine spätere Visualisierung der DNA mithilfe eines Blue/Green LED Transilluminators (FastGene® FAS-DIGI, Nippon Genetics Europe, Düren, DE) ermöglicht. Die Fragmente wurden bei einer Spannung von 120 V aufgetrennt.

2.6.5. Aufreinigung des PCR-Produktes

Die Aufreinigung der DNA-Fragmente aus dem PCR-Ansatz oder aus einem präparativen Agarose-Gel wurde mit den Kits GeneJet PCR Purification oder GeneJet Gelextraction (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) durchgeführt. Dabei wurden die Protokolle des Herstellers angewandt, lediglich die Elution der Fragmente erfolgte in 20 µl Ampuwa® Wasser (Fresenius Kabi Deutschland GmbH, DE).

2.7. Versuchsreihen

Zur Untersuchung des Einflusses bakterieller Aktivität auf den Zerfall und den Abbau von Weichgewebe wurden acht verschiedene Zerfallsexperimente geplant. Als Studienorganismus wurde der Braunblaue Zwergflusskrebs *Cambarellus diminutus* (Animalia; Arthropoda; Malacostraca; Decapoda; Cambaridae, *Cambarellus*) gewählt. Um den Einfluss äußerer Faktoren (Ernährung, Aquarienbepflanzung und -bewässerung) und den Eintrag ungewollter Mikroorganismen (Kontaminationen über die Zoohändler) zu verringern, wurde zu Beginn des Projektes eine eigene *C. diminutus* Zucht etabliert. Die Aufzucht, Einschläferung und Vorbereitung der Krebse erfolgte im Institut für

2. Material und Methoden

Geowissenschaften (Abteilung Paläontologie). Pro Versuchstag wurden das Mikrobiom von drei verschiedenen Tieren (individuelle, biologische Replikate) analysiert, um den Einfluss möglicher Zufallsergebnisse zu minimieren. Das verwendete Süßwasser und das Sediment wurden aus einem See in Bonn-Röttgen (Alte Tongrube in Röttgen, 50.67406211334373, 7.074960227928857) entnommen. Insgesamt wurden acht Versuchsreihen durchgeführt, die den Einfluss unterschiedlicher abiotischer Faktoren auf den Abbau und die Präservierung von Weichgewebe und die Zusammensetzung des Mikrobioms untersuchen sollten. In Abbildung 3 sind die unterschiedlichen Versuchsreihen dargestellt.

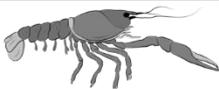
	4 °C		24 °C	
unsteril	 Versuchsreihe 3	 Versuchsreihe 7	 Versuchsreihe 1	 Versuchsreihe 5
steril	 Versuchsreihe 4	 Versuchsreihe 8	 Versuchsreihe 2	 Versuchsreihe 6
	Aerobe Startbedingungen	Anaerobe Startbedingungen	Aerobe Startbedingungen	Anaerobe Startbedingungen

Abbildung 3: Übersicht über die Versuchsreihen und die unterschiedlichen abiotischen und biotischen Bedingungen. Es wurden zwei verschiedene Temperaturen (4 °C, 24 °C), zwei Sauerstoffbedingungen zu Beginn der Experimente (aerobe und anaerobe Startbedingungen) und der Einfluss der extrinsischen Flora (unsteril und steril) untersucht. Bei den unsterilen Versuchen (in blau eingefärbt) wurde das Seewasser und das Sediment unbehandelt eingesetzt, wohingegen in den sterilen Experimenten (in orange eingefärbt) beides zuvor für 15 min, bei 121 °C autoklaviert wurde.

Ein wichtiger Parameter, der vor allem die enzymatische Aktivität von Mikroorganismen beeinflusst, ist die Temperatur, weswegen Versuche bei 4 °C und 24 °C durchgeführt wurden. Zusätzlich dazu wurde der Sauerstoffgehalt zu Versuchsbeginn mithilfe von speziellen Gaserzeugungssystemen (BD Difco™ GasPak™ EZ Anaerobier Pouch System, BD Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, USA) verändert. Diese Systeme generieren ein anaerobes Milieu und sollen somit das Wachstum strikt aerober Mikroorganismen verhindern. Um die Frage zu klären, woher die Bakterien stammen (extrinsisch/intrinsisch), die die Abbau- oder Präservierungsprozesse dominieren, wurden zwei verschiedene Versuchsaufbauten geplant. Bei einem Aufbau wurden das Seewasser und das Sediment unbehandelt in die Versuche eingesetzt, in einem anderen wurden beide Komponenten zunächst autoklaviert, um alle externen Bakterien abzutöten.

2.7.1. Vorversuche & Versuchsaufbau

Im Vorfeld der Versuchsreihen sollten in einem Vorversuch zwei Parameter untersucht werden. Zum einen wurde Wasser aus zwei verschiedenen Quellen (Aquarienwasser, Seewasser aus Bonn-Röttgen) verwendet und zum anderen sollte eine Vorbehandlung des Wassers mit Filtern (Sterilfilter FP 30/0.45, Porengröße: 0,45 μm , Whatman plc, Maidstone, GB) zum Ausschluss von Protozoen getestet werden. Anhand der Ergebnisse dieses Vorversuches wurde anschließend der Versuchsaufbau für die weiteren Experimente festgelegt.

Zur Versuchsbeginn wurden die benötigten Flusskrebse im Institut für Geowissenschaften (Abteilung: Paläontologie) mit CO_2 eingeschläfert. Anschließend wurden die Tiere gewogen, vermessen und optische Besonderheiten notiert. Das Wasser für die sterilen Versuche wurde am Vortag für mindestens 20 min auf 121 °C in einem Autoklaven sterilisiert. Zusätzlich dazu wurden auch die vorbereiteten Netze (Brema Fliegengitter (Nr. 895464)), auf die die Krebse in den Falcons gelegt wurden, autoklaviert. Alle Versuchsreihen wurden unter einer Sterilbank im Institut für medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Parasitologie (IMMIP) unter sterilen Bedingungen ange-setzt. Hierfür wurde zuerst eine Schicht Sediment in die Falcons gefüllt. Danach wurden die Krebse auf sterilen Nylonnetzen auf das Sediment aufgelegt und die Gefäße mit ca. 40 ml Seewasser aufgefüllt. Die Falcons wurden sowohl bei den anaeroben, als auch bei den aeroben Versuchsreihen nicht fest verschlossen, um entweder eine Luftzirkulation oder die Generierung des sauerstoffarmen Milieus über die Gasgenerierungssysteme zu ermöglichen. Bei den anaeroben Versuchen wurden zusätzlich noch 10 mM β -Mercaptoethanol (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) zugegeben, um reduzierende Bedingungen zu schaffen und so die Autolyse des Gewebes zu verhindern. Die Falcons wurden gebündelt nach Versuchstag in GasPak™ Beuteln mit einem Gaserzeugungssystem gelagert (BD Difco™ GasPak™ EZ Anaerobier Pouch System, BD Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, USA). Anhand eines Indikatorstreifens (BD Difco™ GasPak™ EZ Anaerob Indikator, BD Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, USA) wurde überprüft, ob der

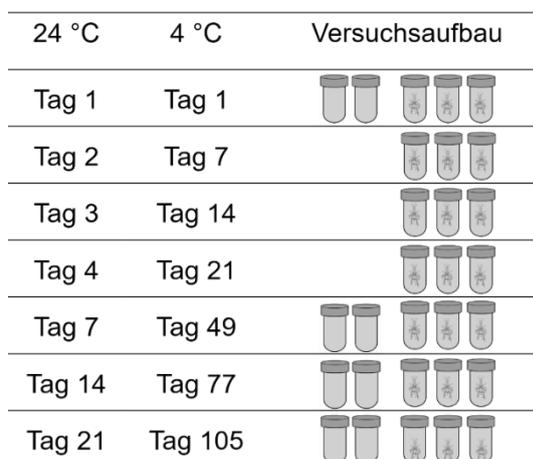


Abbildung 4: Übersicht über den Versuchsaufbau und die Probenahmetage. An vier Tagen wurden zusätzlich zu den Gewebeprobe-n Wassernullproben analysiert. Die Versuchsdauer wurde bei 4 °C verlängert, da die bakterielle Aktivität in kalter Umgebung verlangsamt ist.

Sauerstoffausschluss über den gesamten Versuchsablauf aufrechterhalten werden konnte. In den Versuchsreihen wurde der Zerfall der Flusskrebse und die Veränderungen des Mikrobioms über eine vorher festgelegte Zeitspanne beobachtet. Vorversuche bei 6 °C und 30 °C zeigten eine deutliche Verlangsamung des Zerfallsprozesses bei kühleren Temperaturen weswegen die Versuchsdauer bei den Versuchsreihen bei 4 °C entsprechend verlängert wurde. An den in Abbildung 4 dargestellten Tagen wurde in Triplikaten eine Probe genommen und die DNA des Gewebes und des Wassers der Probe extrahiert. Zu Beginn des Experiments und an den Tagen 7, 14, 21, bzw. 49, 77, 105 bei 4 °C, wurden zusätzlich noch Wassernullproben genommen. Bei den Nullproben wurde das Experiment ohne Flusskrebs angesetzt. Aus allen anderen Proben wurden die Flusskrebse am Versuchstag entnommen und anschließend die DNA der Probe aufgereinigt (siehe Abschnitt 2.7.3.). Weitere geochemische und taxonomische Analysen wurden im Institut für Geowissenschaften (Abteilung: Paläontologie) mit anderen Versuchstieren durchgeführt.

2.7.2. Kontrollen des Kits

Die Effizienz des verwendeten Kits wurde durch die Verwendung einer bekannten bakteriellen Gemeinschaft („Mock-Gemeinschaft“) überprüft. Der ZymoBIOMICS Microbial Community Standard (D6300, Zymo Research, Irvine, USA) ist aus acht verschiedenen Bakterienstämmen zusammengesetzt, die aufgrund ihres Zellwandaufbaus unterschiedlich schwer zu lysieren sind (siehe Tabelle 8). Zusätzlich beinhaltet der Standard auch noch zwei Pilzspezies, die allerdings in diesem Projekt nicht untersucht wurden. Alle Genera machen jeweils 12 % der bakteriellen Zusammensetzung aus. Da die 16S-Genkopien allerdings unterschiedlich oft im Genom vorliegen, ergibt sich für die einzelnen Genera eine unterschiedliche Verteilung, die in Tabelle 8 detailliert aufgeführt ist. Es wurden Triplikate analysiert und jeweils 75 µl des Standards direkt zu der Lysis-Lösung hinzugegeben und im weiteren Verlauf wie eine normale Probe prozessiert.

2. Material und Methoden

Tabelle 8: Zusammensetzung des ZymoBIOMICS Microbial Community Standards (D6300). Anhand der bekannten bakteriellen Gemeinschaft wurde die Effizienz des verwendeten Kits zur DNA-Extraktion untersucht. Der Standard ist aus acht verschiedenen Bakterien zusammengesetzt, die einen unterschiedlichen Zellwandaufbau zeigen und dementsprechend verschieden gut aufgeschlossen werden können. Mb = Megabasen, G+ = Gram-positiv, G- = Gram-negativ

Spezies	Genomgröße (Mb)	Genomische DNA (%)	Anteil 16S (%)	Gram Verhalten	Lysis Verhalten
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6.77	12	4.2	G-	Einfache Lyse
<i>Escherichia coli</i>	5.47	12	10.1	G-	Einfache Lyse
<i>Salmonella enterica</i>	4.83	12	10.4	G-	Einfache Lyse
<i>Lactobacillus fermentum</i>	2.08	12	18.4	G+	Schwierige Lyse
<i>Enterococcus faecalis</i>	3.01	12	9.9	G+	Schwierige Lyse
<i>Staphylococcus aureus</i>	2.93	12	15.5	G+	Schwierige Lyse
<i>Listeria monocytogenes</i>	2.95	12	14.1	G+	Schwierige Lyse
<i>Bacillus subtilis</i>	3.98	12	17.4	G+	Schwierige Lyse

2.7.3. Extraktion der bakteriellen DNA der gesamten Probe

Die Extraktion der bakteriellen DNA aus den Proben wurde mit dem ZymoBIOMICS™ DNA Miniprep Kit (Zymo Research, Irvine, USA) durchgeführt. Neben dem Flusskrebsgewebe wurde ebenfalls das Wasser und bei ausgewählten Proben das Sediment aufgereinigt. Zur Vorbehandlung wurde das Gewebe mit 300 µl PBS in ein Precellys Bead Beating Tube (Bertin Technologies SAS, Montigny-le-Bretonneux, FR), gefüllt mit Keramikbeads (Ø 2,8 mm, Bertin Technologies SAS, Montigny-le-Bretonneux, FR), gegeben und bei 5.000 x g, für drei Zyklen aus 20 s Bead Beating und 40 s Pause bei RT in einem Precellys Tissue Homogenizer (Bertin Technologies SAS, Montigny-le-Bretonneux, FR) homogenisiert. Anschließend wurden 40 µl des Homogenisats zur Konservierung in vorbereitete Kryogefäße gefüllt. Das restliche Homogenisat wurde für die DNA-Extraktion verwendet. Bei den Wassernullproben wurden direkt 150 µl Flüssigkeit für die Kryokonservierung eingesetzt und die Proben im Anschluss mit einem Mehrfachfilterhalter und einem Cellulose-Filter mit einer Porengröße von 0,22 µm (PORA NC Einmalfilter, Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, GER) gefiltert. Der Filter wurde anschließend zerschnitten und alle Stücke für die weitere DNA-Aufreinigung verwendet. Vom Sediment wurden 250 mg direkt in die vom Hersteller mitgelieferten Lysis-Gefäße eingewogen. Zu dem Probenmaterial wurden ca. 750 µl Lysis-Puffer zugegeben und die Bakterien über Bead Beating (6.000 x g, 3 x 60 s, 120 s Pause, RT) aufgeschlossen. Die restliche DNA-Extraktion wurde wie vom Hersteller beschrieben durchgeführt. Zur Elution der DNA wurde das DNase-/RNase-freie Wasser auf 60 °C erwärmt und 50 µl auf die Säule

gegeben. Nach 2 min Inkubation wurde die DNA durch Zentrifugation eluiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C eingefroren.

2.7.4. 16S-rRNA-Amplikon Sequenzierung (Illumina)

Die Sequenzierung der 16S-rRNA-Gensequenz des bakteriellen Mikrobioms wurde von der Firma Molecular Research DNA (USA) mit der von ihnen entwickelten „bacterial tag-encoded FLX amplicon pyrosequencing“ (bTEFAP®) - Methode (Sun *et al.*, 2011) durchgeführt. Dafür wurde zuerst die variable V4-Region der 16S-rRNA-Gensequenz mit den Primern 515F/806R (siehe Tabelle 9) amplifiziert (Caporaso *et al.*, 2011). Durchgeführt wurde die PCR mit dem HotStarTaq Plus Master Mix Kit (Qiagen, USA) und dem in Tabelle 9 dargestellten PCR-Programm. In einer zweiten PCR wurden unter den gleichen Bedingungen spezielle Adapter angehängt. Diese sogenannten „Linker-Sequenzen“, die für jede Probe spezifisch sind, ermöglichen eine Hochdurchsatz-Sequenzierung mehrerer Proben (Sun *et al.*, 2011). Die Sequenzierung der Amplikons erfolgte anschließend mit einem MiSeq™-System (Illumina, USA).

Tabelle 9: Übersicht über die Primer und das PCR-Programm, die von der Sequenzierfirma (MR DNA) zur Amplifikation der 16S-rRNA-Gensequenz verwendet wurden.

Name	16S-Orientierung	Sequenz (5' - 3')	Quelle
16s-515F	515F	GTG CCA GCM GCC GCG GTA A	Caporaso <i>et al.</i> , 2011
16s-806R	806	GGA CTA CVS GGG TAT CTA AT	Caporaso <i>et al.</i> , 2011

PCR-Programm MR DNA		
94 °C	3 min	
94 °C	30 s	
53 °C	40 s	28 x
72 °C	1 min	
72 °C	5 min	

2.7.5. Bioinformatische Analyse der Rohdaten

Die Rohdaten, die bei der Sequenzierung generiert wurden, mussten für die ausführlichen Analysen zuerst über eine spezielle bioinformatische Pipeline prozessiert werden. Das hierfür erstellte Skript ist im Anhang („Ausführliche Pipeline zur Prozessierung der Rohdaten“) vorzufinden. Dafür wurden die Computerprogramme „QIIME2“ (Bolyen *et al.*, 2019) und „R“ mit zusätzlichen Paketen

(siehe Tabelle 10) verwendet. Die QIIME2-Plattform ist eine spezielle, Linux-basierte Analysesoftware, die auf große Datenmengen spezialisiert ist und durch vielfältige Plugins die Prozessierung verschiedenster Datentypen ermöglicht. Die Rohdaten wurden im Format „Casava 1.8“ übermittelt, was bedeutet, dass die Sequenzierdaten bereits den einzelnen Proben anhand der passenden Erkennungssequenzen zugeordnet wurden. Aus diesem Grund konnte der „Demultiplexing“-Schritt, der üblicherweise zu Beginn der Prozessierung durchgeführt wird, übersprungen werden. Zuerst wurden die Primer mithilfe der Software Fastq Processor (<https://www.mrdnlab.com/mrdnafreesoftware/fastq-processor.html>, Stand: 02.09.2021), die von der Sequenzierfirma bereitgestellt wird, abgeschnitten und die Sequenzen in das richtige Dateiformat überführt. Nach dem Import der Daten in die QIIME2-Arbeitsumgebung wurde über einen „Denoising“-Schritt der Vorwärts- und Rückwärtsstrang der Sequenz übereinander gelagert und Bereiche mit einer schlechten Qualität und Chimeren herausgefiltert. Das „Denoising“ wurde mit dem speziellen Plugin „Dada2“ (Callahan *et al.*, 2016) durchgeführt. Dabei werden die Sequenzen miteinander verglichen und gleiche Sequenzen zu sogenannten Amplicon-Sequenzier-Varianten („Amplicon Sequencing Variants“, ASVs) zusammengeordnet. Die Sequenzen unterscheiden sich teilweise nur um eine oder zwei Basen, wodurch dieses Vorgehen deutlich genauer ist als die Einteilung in „Operational Taxonomic Units“, was in der veralteten Vorgehensweise mit einem Schwellenwert von 97 % Gleichheit erfolgte. Im Anschluss an die Qualitätskontrolle konnten verschiedene Läufe, deren Sequenzen miteinander verglichen werden sollten, zusammengefügt werden. Außerdem wurden optional sehr seltene oder nur gering vorkommende ASVs rausgefiltert, bevor die übrigen ASVs dann anhand der Datenbank SILVA (Version: silva-132-99-515-806-n-classifier) taxonomisch zugeordnet werden konnten. Zusätzlich zu den bisher beschriebenen Schritten wurde in der QIIME2-Arbeitsumgebung die Sequenziertiefe mithilfe einer Rarefaction-Analyse überprüft und ein phylogenetischer Baum erstellt. Der phylogenetische Baum, der die Verwandtschaftsverhältnisse der Bakterien überprüft, dient als Voraussetzung für weitere Analysen, wie der α - und β -Diversität. Nach dem Export der Daten können diese für weitere Untersuchungen und graphische Darstellungen in R bearbeitet werden.

Die Zuordnung der ASVs zu spezifischen metabolischen Eigenschaften, wie der Synthese spezieller Enzyme oder der Fähigkeit einen Biofilm zu bilden, wurde über die Programme BugBase (Ward *et al.*, 2017) und PICRUSt2 (Douglas *et al.*, 2020) durchgeführt. PICRUSt2 ist als Plugin in die QIIME2-Arbeitsumgebung integriert, BugBase kann als eigenständiges Programm auf der entsprechenden Internetseite genutzt werden (<https://bugbase.cs.umn.edu/>, Stand: 03.09.2021).

Tabelle 10: Übersicht über die verwendeten Pakete in R.

Paket	Analyse/Funktion	Quelle
R Core	Grundlegende Funktionen	version 4.0.5 R Core Team, 2020
tidyverse (ggplot2)	Grundlegende Funktionen zur Bearbeitung großer Datensätze, graphische Darstellung	version Wickham, 2016
vegan	Deskriptive multivariate Analyse von Mikrobiomdaten (Bray-Curtis dissimilarity, PERMANOVA, Diversitätsindizes, Berechnungen zur Erstellung eines NMDS)	version 2.5.6 Oksanen <i>et al.</i> , 2019
caroline	Berechnung von Prozentzahlen	version 0.7.6 Schruth, 2013
RAM	Deskriptive multivariate Analyse von Mikrobiomdaten	version 1.2.1.7 Chen <i>et al.</i> , 2018
RColorBrewer	Farbpalette	version 1.1-2 Neuwirth, 2014
pheatmap	Erstellung einer Heatmap	version 1.0.12 Kolde, 2019

2.7.2. Sterilisierung des Krebsgewebes

In zukünftigen Versuchen soll Gewebe mit einzelnen, isolierten Organismen behandelt werden. Dabei soll das Präservierungs- oder Abbaupotential dieser Bakterien untersucht werden. Damit die intrinsische Flora des Gewebes bei diesen Experimenten ausgeschlossen werden kann, muss das Gewebe im Vorfeld sterilisiert werden. Hierfür wurde eine Methode zur Sterilisation von Weichgewebe mittels Antibiotika-Behandlung etabliert. Das Gewebe wurde zuerst in ≥ 80 %igem Ethanol gewaschen und das Ethanol anschließend unter einer Sterilbank abgedampft. Die verwendeten Breitband-Antibiotika wurden am Versuchstag immer frisch angesetzt. Es wurde eine Mischung aus Tetrazyklin und Ciprofloxacin (beide Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) mit jeweils einer Endkonzentration von 40 $\mu\text{g/ml}$ in sterilem Milli-Q® Wasser angesetzt, um ein breites Spektrum an Bakterien ausschließen zu können (Campoli-Richards *et al.*, 1988; Nelson & Levy, 2011). Das Gewebe wurde für 6 h in der Antibiotika-Lösung bei RT, lichtgeschützt inkubiert. Im Anschluss musste das Gewebe dann mindestens zehn Mal für 10 Minuten in 10 ml sterilem Milli-Q® Wasser gewaschen werden, da Antibiotika-Rückstände das Wachstum der gewünschten Bakterien im Versuchsaufbau stören würden.

2.8. Isolation von Organismen & Charakterisierung

Während der Versuchsreihen sollten mithilfe unterschiedlicher Nährmedien und Anzuchtmethoden Bakterien aus den Wasser- und Gewebequellen isoliert werden, um eine umfassende Analyse der beteiligten Organismen zu ermöglichen. Bei den Wasserproben wurden sowohl die Nullproben, als auch das umgebende Wasser der Gewebeprobe verwendet. Diese Bakterien wurden im weiteren Verlauf identifiziert und auf ihre typischen Eigenschaften untersucht.

2.8.1. Isolation der Organismen

Die Kultivierung der Bakterien erfolgte auf speziellen Nährmedien. Die Temperatur, bei der die Isolationsmedien inkubiert wurden, wurden an die Temperatur der Versuchsreihen angepasst. Alle Methoden wurden sowohl aerob, als auch anaerob durchgeführt. Zur anaeroben Bebrütung wurden die Platten in einem Anaerobtopf oder Anaerobenbeutel mit speziellen Gaserzeugungssystemen (BD Difco™ GasPak™ EZ Anaerob System, BD Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, USA) inkubiert. Bei den Wasserproben wurden Verdünnungsreihen angesetzt. Je nach Zeitpunkt der Probennahme wurden die Proben bis zu 10^{-8} verdünnt. Von den Verdünnungen wurden je 100 µl ausplattiert. Zu Beginn des Projektes wurden die Proben sowohl auf COL-S-Blutagar-, TSA-, R2A-, Minimal-LB-, als auch auf MacConkey-Agar ausplattiert. Im weiteren Verlauf wurde die Plattenanzahl auf R2A- und COL-S-Platten reduziert, um Doppelbestimmungen zu vermeiden. Zusätzlich zu der klassischen Anzuchtmethode auf Festmedium wurde die „Extinction-to-Dilution“-Methode mit einem speziellen Medium für oligotrophe Organismen durchgeführt (Gläser *et al.*, 2013). Bei dieser Methode wurden Wasserproben bis zu 10^{-10} in einer 96-Well-Platte in dem speziellen Medium verdünnt, die Platte mit einer Sauerstoff-permeablen Folie verschlossen und für 10 Wochen inkubiert. Nach der Anreicherungsphase wurden 50 µl aus jedem Well auf eine Agarplatte mit dem speziellen Medium ausplattiert (siehe Tabelle 11). Durch die starke Verdünnung und die Verwendung des Mediums zur Anzucht von oligotrophen Organismen soll das Wachstum schnell-wachsender Organismen verhindert werden. Viele Umweltbakterien sind an das Vorhandensein ausreichender Nährstoffmengen nicht angepasst und setzen sich nur unter Nährstoffmangel durch (Button, 1993). Um eine zu starke Verdunstung zu reduzieren, sollten die äußeren Wells nicht mit Probenmaterial, sondern mit 200 µl Milli-Q® Wasser befüllt werden.

2. Material und Methoden

Tabelle 11: Zusammensetzung des Mediums, das zur selektiven Anzucht von Umweltbakterien verwendet wurde.

Medium für oligotrophe Organismen (angelehnt an Gläser <i>et al.</i>, 2013)		pH 7,5
Hefeextrakt	15 g	
Bacto™ Trypton	30 g	
NaCl	30 g	
sterilfiltriertes Seewasser	25 ml	
optional: Agar	18 g	
dH ₂ O	ad. 1 l	

Bei den Gewebeproben lag vor allem die Isolation von Biofilm bildenden Organismen im Fokus. Zu diesem Zweck wurde die Oberfläche der Krebse vor der DNA-Extraktion mit sterilen Tupfern abgestrichen. Eine 96-Well-Platte mit U-Boden wurde mit je 200 µl TSB + 1 % Glucose vorbereitet und das Zellmaterial auf den Tupfern in der ersten Spalte in Doppelbestimmung resuspendiert. Von dieser Spalte ausgehend wurden je 20 µl in die nächsten Spalten überführt und so eine Verdünnungsreihe angelegt. Die letzte Spalte wurde als Sterilkontrolle des Mediums nicht beimpft. Die Platten wurden mindestens drei Tage inkubiert, um die Bildung eines Biofilms zu ermöglichen. Hierbei wurde die Temperatur an die Versuchsreihen angepasst und die Platten, die bei niedrigen Temperaturen gelagert wurden, für einen längeren Zeitraum inkubiert. Nach der Bebrütung wurde das Medium abgenommen und die Wells drei Mal mit PBS gewaschen, um ungebundene Bakterien abzuwaschen und nur die Organismen zu isolieren, die an die Polystyrol-Oberfläche der 96-Well-Platte adhärirt und einen Biofilm gebildet hatten. Nach einer kurzen Trocknung wurden die Wells mit sterilen Tupfern ausgestrichen und das Zellmaterial auf frischen COL-S-Platten ausgeimpft. Die Platten wurden erneut bei der entsprechenden Temperatur für ein bis fünf Tage inkubiert und das Bakterienwachstum dokumentiert. Sofern keine Reinkulturen vorlagen, wurden die Kolonien mehrfach überimpft, um die verschiedenen Bakterienarten einzeln isolieren zu können.

2.8.2. Artbestimmung der Organismen

Die isolierten Organismen wurden mithilfe unterschiedlicher Methoden typisiert. Die schnellste Methode ist die Identifizierung via MALDI-TOF/MS, die vom Institut für Hygiene und Public Health durchgeführt wurde. Allerdings ist die Datenbank des Bruker-Gerätes auf die Identifizierung von pathogenen, medizinischen Organismen optimiert, wodurch eine Zuordnung der Spektren in vielen Fällen nicht möglich war. Eine Alternative dazu stellt die Typisierung der Bakterien über die 16S-rRNA-Gensequenz dar. Hierfür kann entweder eine Kolonie-PCR oder - im Falle von

schwer zu lysierenden Organismen - erst eine Extraktion der genomischen DNA mit anschließender klassischer PCR durchgeführt werden.

2.8.2.1. MALDI-TOF/MS zur Identifizierung von Organismen (Microflex® LT MALDI-TOF/MS)

Die Identifizierung von Spezies mithilfe einer Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization - Time of Flight Massenspektrometrie (MALDI-TOF/MS) aus einer Reinkultur ist in der klinischen Mikrobiologie weit verbreitet (Bader, 2013). Zellmaterial, von einer gewachsenen Kolonie auf einer Agarplatte oder aus einem Flüssigmedium, kann ohne weitere Vorbehandlung, direkt auf die Target-Platte aufgetragen werden. Anschließend werden die Zellen mit einer Matrix (α -Cyano-4-Hydroxy-Zimtsäure [HCCA] in Acetonitril: 0.1% TFA in Milli-Q®-H₂O, 1:3) umschlossen, was zu einer Zellyse führt. Ein Trockenschritt führt zur Co-Kristallisation der Zellkomponenten mit der Matrix. Werden diese mit einem gepulsten, hochenergetischen Laserstrahl beschossen, verdampft die kristallisierte Matrix und ionisierte Moleküle werden freigesetzt. Die Flugzeit und die Flugbahn der Moleküle im angelegten elektrischen Feld sind massen- und ladungsspezifisch. Das so erhaltene Spektrum kann im Anschluss mit einer zentralen Datenbank (MALDI Biotyper® IVD System, Server Version 4.1.90 (PYTH)) abgeglichen und bekannten Spektren zugeordnet werden. Die Differenzierung von Organismen anhand ihrer Spektren erfolgt bis auf Spezies-Ebene und unterscheidet sich zum Teil stark zwischen Spezies gleicher Genera (Bader, 2013). Die bekannten Datenbanken beinhalten vor allem die Spektren klinisch relevanter Krankheitserreger, weswegen die Identifizierung von eher unbekanntem Bakterien aus Umweltproben mit dieser Methode schwierig ist.

2.8.2.2. Extraktion der genomischen DNA einzelner Organismen

Zur Extraktion der genomischen DNA wurde das DNeasy® UltraClean® Microbial Kit (Qiagen GmbH, Hilden, DE) verwendet. Dazu wurden 5 ml Flüssigmedium mit dem gewünschten Organismus angeimpft und bei 30 °C und 170 rpm bebrütet. Je nach Wachstum des Organismus wurde LB-, TSB- oder BHI-Medium verwendet und unterschiedlich lange inkubiert (Zusammensetzung der Medien siehe Tabelle 5). Die Extraktion wurde wie vom Hersteller empfohlen durchgeführt, der Zellaufschluss erfolgte mithilfe der im Kit vorhandenen PowerBead Tubes in einem speziellen Vortex Adapter (Vortex-Genie 2 Vortex,

2. Material und Methoden

Qiagen, DE). Die DNA wurde in 30 µl erwärmtem Ampuwa® Wasser eluiert. Im Anschluss an die Extraktion wurde die DNA-Konzentration bestimmt und entsprechend der Konzentration eine 16S-rRNA-PCR angesetzt. Die 16S-rRNA-Sequenz wurde mit den Primern GM3F und GM4R (siehe Tabelle 6) und dem unter Abschnitt 2.6.3. beschriebenen PCR-Programm amplifiziert. Anschließend wurde das PCR-Produkt aufgereinigt und bis zur weiteren Verwendung bei - 20 °C gelagert.

2.8.2.3. 16S-rRNA Sequenzierung nach Sanger

Die Sequenzierung wurde von den Firmen GATC Biotech AG (Konstanz, DE) oder Microsynth (Balgach, CH) durchgeführt. Die DNA-Sequenzierung erfolgte nach der von Sanger (1977) beschriebenen Methode. Zur Sequenzierung wurde die zuvor amplifizierte 16S-rRNA-Gensequenz mithilfe des Primers GM8Rneu (siehe Tabelle 6) analysiert. Mit diesem Primer kann ein ca. 700 bp großer Bereich der hypervariablen 16S-rRNA-Gensequenz sequenziert werden. In manchen Fällen war es notwendig, einen größeren Bereich abzudecken, um eine genaue Zuordnung zu einer Spezies garantieren zu können. Dafür wurden zusätzlich noch weitere Ansätze mit dem Primer 1114F oder GM1F (siehe Tabelle 6) analysiert. Die Orientierung der verwendeten Sequenzierungsprimer ist in Abbildung 5 dargestellt.

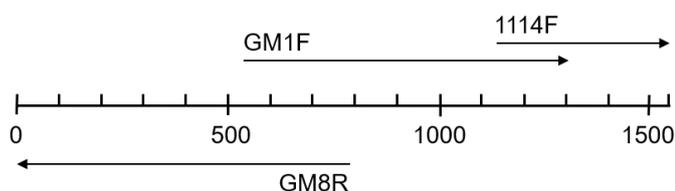


Abbildung 5: Graphische Darstellung der Bindungsstellen der verwendeten Sequenzierungsprimer auf der 16S-rRNA-Gensequenz. Mit den Primern kann insgesamt ein ungefähr 1500 bp langer Bereich abgedeckt werden.

Die DNA-Sequenz wurde mit der Datenbank EZBioCloud abgeglichen (Yoon *et al.*, 2017). Bei einer Ähnlichkeit (Similarity) von weniger als 98,75 % konnte die Sequenz keiner bestimmten Spezies zugeordnet werden. Diese Organismen wurden an die Arbeitsgruppe Lipski weitergegeben, die auf die Charakterisierung neuer Arten spezialisiert ist.

2.8.2. Charakterisierung der isolierten Organismen

Die isolierten Organismen wurden auf ihre Eigenschaften untersucht. Dabei wurden vor allem Charakteristika analysiert, die einen Einfluss auf das Abbau- beziehungsweise Präservierungsverhalten der Bakterien haben könnten. Hierzu zählen die Synthese spezifischer Exoenzyme, wie Chitinasen, Lipasen oder Proteasen, aber auch die Fähigkeit Biomineralien oder Biofilme zu bilden.

2.8.2.1. Chitinase (EC 3.2.1.14)

In diesem Projekt wurde der Abbau und die Präservierung von Arthropoden untersucht, weswegen die Bildung einer Chitinase zum Abbau des chitinhaltigen Panzers von besonderem Interesse war. Chitinasen katalysieren die Hydrolyse der glykosidischen Bindung des Polysaccharids Chitin (Bhattacharya *et al.*, 2007). Das Krabbenchitin (> 95 % Acetylierungsgrad, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) musste vor der Zugabe zum Nährmedium vorbehandelt werden, da sich das Chitin nur in kolloidaler Form im Nährmedium löst. Zur Herstellung des kolloidalen Chitins wurden 10 g Chitin mit 150 ml 37 % HCl versetzt und über Nacht gerührt, bis die Chitinflocken komplett gelöst waren. Am nächsten Tag wurde die Suspension über einen Faltenfilter (qualitativ, 595 ½, Waktman plc, Maidstone, GB) langsam in 1 l gekühltes Wasser gefiltert, wobei das Chitin als weißer Niederschlag ausfiel. Diese Lösung wurde dann für 20 min bei 3.000 x g und RT zentrifugiert und das Pellet in 200 ml kaltem dH₂O gewaschen. Dieser Waschschritt wurde so lange wiederholt, bis der pH der Lösung bei mindestens 3,5 lag. Nach der letzten Zentrifugation wurde der Überstand abgenommen und das Pellet im Wärmeschrank getrocknet. Nach der Trocknung wurde das Chitin pulverisiert und eine 10 %ige Chitinlösung angesetzt, die nach dem Autoklavieren, dem Nährmedium zugesetzt werden konnte. Die gesamte Zusammensetzung des Agars ist in Tabelle 12 aufgeführt.

Tabelle 12: Zusammensetzung des Chitin-Salts-Agars. Durch die Ausbildung einer Chitinase sind die Organismen in der Lage das Chitin im Agar zu hydrolysieren. Eine positive Reaktion zeigt sich zur die Ausbildung eines klaren Hofes rund um die Kolonie.

Chitin-Salts-Agar (Molise & Drake, 1973)	pH 7,5
K ₂ HPO ₄	2 mM
MgSO ₄	2 mM
Casamino Acids	2 g
Kolloidales Chitin	2,5 g
Agar	18 g
dH ₂ O	ad. 1 l

2. Material und Methoden

Zur Untersuchung, ob ein Bakterium die Fähigkeit besitzt eine Chitinase zu synthetisieren, wurde etwas Koloniematerial mit einer Impfnadel von einer Agarplatte abgenommen und in den trüben Chitin-Salts-Agar gestochen. Dann wurde die Platte für 48 - 72 h bei 30 °C inkubiert. In dem Fall, dass die Bakterien das zugesetzte kolloidale Chitin hydrolysieren konnten, wurde ein klarer Hof rund um die Kolonie sichtbar.

2.8.2.2. Bildung einer Protease (EC 3.4)

Eine Vielzahl an Mikroorganismen synthetisieren Proteasen, die die Hydrolyse von Peptidbindungen zwischen einzelnen Aminosäuren katalysieren. Manche Proteasen können lediglich endständige Bindungen abspalten (Exopeptidasen), andere sind dagegen auch in der Lage, innerhalb einer Polypeptidkette (Endopeptidase) zu hydrolysieren. Die Synthese einer Protease bei den isolierten Organismen wurde mithilfe des Skim-Milk-Agars überprüft (siehe Tabelle 13). Durch die Zugabe von Magermilchpulver (engl. skim milk, Merck KGaA, Darmstadt, DE) zeigte der Agar eine Trübung. Waren die Bakterien in der Lage, die Proteine in der Magermilch abzubauen, wiesen die Kolonien nach einer Inkubationszeit von 48 - 72 h bei 30 °C einen klaren Hof rundherum auf.

Tabelle 13: Zusammensetzung des Skim-Milk-Agars. Bakterien, die Proteasen ausbilden, können die Proteine in der zugesetzten Magermilch hydrolysieren und die Produkte zur Energiegewinnung nutzen. Eine positive Reaktion wird durch einen klaren Hof rund um die Kolonie sichtbar.

Skim-Milk-Agar (Jones et al., 2007)	pH 7,5
Hefeextrakt	5 g
Bacto™Trypton	10 g
NaCl	10 g
Agar	18 g
Magermilchpulver	10 % (w/v)
dH ₂ O	ad. 1 l

2.8.2.3. Bildung einer Lipase (EC 3.1.1.3)

Weitere abbauende Enzyme beinhaltet die Gruppe der Lipasen, die eine Spaltung von Triacylglyceriden zu Diacylglyceriden, Monoacylglyceriden, Glycerol und freien Fettsäuren katalysieren (Macrae & Hammond, 1985). Diese Fähigkeit wurde mit einem Rhodamin-Olivenöl-Agar untersucht, dessen Zusammensetzung in Tabelle 14 aufgeführt ist. Als Substrat wurde Olivenöl (Gut & Günstig, Edeka-Gruppe, DE) eingesetzt, das separat autoklaviert werden musste. Außerdem wurde der Farbstoff Rhodamin B (Merck KGaA,

2. Material und Methoden

Darmstadt, DE) dem Agar zugesetzt. Sobald die Bakterien die Triglyceride im Olivenöl aufgespalten haben, können die freien Fettsäuren mit dem Rhodamin B zu einem Konjugat reagieren (Jaeger *et al.*, 1994). Die zu untersuchenden Organismen wurden auf dem Agar ausgestrichen und die Platten anschließend für mindestens 48 h bei 30 °C inkubiert. Die Kolonien von Lipase-produzierenden Organismen erschienen auf den speziellen Agarplatten pink und fluoreszieren unter UV-Licht (UV-Transilluminator Chroma 43, Vetter GmbH, Wiesloch, DE) bei einer Wellenlänge von 250 nm wohingegen Lipase-negative Organismen keine Fluoreszenz zeigten (Jaeger *et al.*, 1994).

Tabelle 14: Zusammensetzung des Rhodamin-Olive-Oil-Agars. Die Bakterien, die Lipasen ausbilden, können die Fette, die durch das Olivenöl dem Agar zugesetzt wurden, hydrolysieren und für die Energiegewinnung nutzen. Freie Fettsäuren reagieren mit dem Farbstoff Rhodamin B, wodurch Lipase-positive Organismen eine Fluoreszenz unter UV-Licht zeigen.

Rhodamin-Olive-Oil-Agar (angepasst von Kouker & Jaeger, 1987)	pH 7,0
Bacto™Trypton	8 g
Hefeextrakt	4 g
NaCl	3 g
Agar	18 g
dH ₂ O	ad. 970 ml
Olivenöl	30 ml
Rhodamin B	2 mg

2.8.2.4. Bildung einer Urease (EC 3.5.1.5)

Die Synthese einer Urease ermöglicht den Bakterien die Verarbeitung von Harnstoff (Urea). Urea wird dabei zu Ammonium und Carbamat, dem Salz der Carbamidsäure, hydrolysiert, wodurch der pH der umgebenden Matrix erhöht wird. Die Veränderung des pH-Wertes kann in Anwesenheit bestimmter Ionen (z.B. Ca²⁺, Mg²⁺) zu einer Kristallausfällung führen. Dieser Prozess ist besonders problematisch in der Intensivpflege, wo die starke Urease-Aktivität von *Proteus mirabilis* in Biofilmen in Kathetern in einer starken Verkrustung und dadurch Verstopfung resultieren kann (Flores-Mireles *et al.*, 2015). Zur Identifizierung von Urease-bildenden Organismen wurde ein spezieller Urease-Agar verwendet (siehe Tabelle 15). Dem Agar wurde neben Harnstoff (Merck KGaA, Darmstadt, DE), ebenfalls Phenolrot (Merck KGaA, Darmstadt, DE) als pH-Indikator zugegeben. Die Organismen wurden auf den Agar geimpft und 48 h bei 30 °C inkubiert. Erhöhte sich der pH des Agars durch die Spaltung von Urea, wurde ein deutlicher Farbumschlag von leicht orange zu pink sichtbar.

2. Material und Methoden

Tabelle 15: Zusammensetzung des Urease-Agars. Durch die Synthese einer Urease können die Bakterien Urea hydrolysieren, was einen pH-Anstieg zur Folge hat. Diese pH-Veränderung wird durch den Indikator Phenolrot sichtbar, indem der Agar einen Farbumschlag von leicht orange zu pink zeigt.

Urease-Agar (Christensen, 1946)	pH 6,8
Bacto™Pepton	1 g
Glucose	1 g
NaCl	5 g
Na ₂ HPO ₄	1,2 g
KH ₂ PO ₄	0,8 g
Phenolrot	0,5 % (w/v)
Agar	18 g
Urea	2 % (w/v)
dH ₂ O	ad. 1 l

2.8.2.5. Analyse der Biofilmbildung

Die isolierten Organismen wurden ebenfalls auf ihre Fähigkeit untersucht Biofilme zu bilden (Stepanović *et al.*, 2000). Dafür wurden die Bakterien in 5 ml TSB-Medium angeimpft und über Nacht bei 30 °C und 170 rpm inkubiert. Am nächsten Tag wurde die OD₆₀₀ bestimmt und bei allen Proben auf eine OD₆₀₀ von 0,5 verdünnt. In einer 96-Well-Platte mit U-Boden (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) wurden 190 µl TSB + 1 % Glucose vorgelegt. In vierfacher Bestimmung wurden 10 µl der vorbereiteten Probe zum Medium dazugegeben. Eine Position wurde immer als Sterilkontrolle des Mediums verwendet und dementsprechend nicht mit Bakterien beimpft. Zu den Randspalten wurden zusätzlich noch 100 µl Milli-Q® Wasser hinzugefügt, um die Verdunstung (Edge-Effekt) zu minimieren (Shukla & Rao, 2017). Die so präparierte Platte wurde für mindestens zwei Tage bei 30 °C inkubiert. Nach der Kultivierung wurden die bewachsenen Nährmedien vorsichtig mit einer Pipette abgenommen und verworfen. Anschließend wurden die Wells drei Mal mit 200 µl PBS gewaschen, um ungebundene Bakterienzellen auszuwaschen. Die Zellen, die an das Polystyrol der 96-Well-Platte binden konnten, wurden daraufhin mit 200 µl 0,2 % Kristallviolett (Merck KGaA, Darmstadt, DE) für 30 min gefärbt. Kristallviolett färbt unspezifisch negativ geladene Oberflächenmoleküle, wie die Polysaccharide im EPS an (Li *et al.*, 2003). Nach der Färbung wurden die Wells erneut drei Mal mit 200 µl PBS gewaschen und für 5 min getrocknet. Für die Auswertung wurden die Wells mit 250 µl einer 33 %igen Essigsäure-Lösung befüllt und für 15 min inkubiert. Bei diesem Schritt wird das an das Zellmaterial gebundene Kristallviolett gelöst und geht in die Essigsäure über. Im Anschluss an diesen Entfärbungsschritt konnte die Absorption bei einer Wellenlänge von 570 nm im Plattenleser Infinite M Plex (Tecan, CH) bestimmt werden. Ausgehend von der Sterilkontrolle

2. Material und Methoden

des Mediums, die als Nullwert verwendet wurde, wurde die Menge an gebildetem Biofilm, und somit die Fähigkeit eines Organismus einen Biofilm aufzubauen, berechnet. Hierbei wurde eine Grenze (cut-off OD = OD_C) festgelegt. Unter einem Wert von drei Standardabweichungen oberhalb des Nullwertes war keine Biofilmbildung sichtbar. Die Zuordnung der OD₅₇₀-Werte zu der Fähigkeit einen Biofilm auszubilden, ist in Tabelle 16 zusammengefasst.

Tabelle 16: Schema zur Einordnung der Fähigkeit einen Biofilm auszubilden. Als Referenzwert wurde die Mediumskontrolle verwendet. OD = optische Dichte, OD_C = Cut-off OD

keine Biofilmbildung	$OD_{570} \leq OD_C$
schwache Biofilmbildung	$OD_C < OD_{570} \leq 2 \times OD_C$
mittlere Biofilmbildung	$2 \times OD_C < OD_{570} \leq 4 \times OD_C$
starke Biofilmbildung	$4 \times OD_C < OD_{570}$

2.8.2.6. Biomineralisierung

Viele Bakterien sind in der Lage, durch ihre metabolische Aktivität die biochemischen Bedingungen in ihrer Umgebung so zu verändern, dass biologisch-induzierte Mineralien ausfallen. Durch BIM werden vor allem Carbonate präzipitiert und die häufigste Ionenquelle für BIM und BCM ist Calcium (50 % aller Biomineralien, Weiner & Dove, 2003). Die Testung der Fähigkeit zur Biomineralisation der isolierten Organismen wurde mit dem 4 x modifizierten B4-Medium (4xmB4-Medium, siehe Tabelle 17) durchgeführt. Das Rezept hierfür basiert auf dem B4-Medium, welches 1973 von Boquet *et al.* zur Isolation von mineralisierenden Organismen beschrieben wurde. Daskalakis *et al.* (2013) konnten eine deutliche Verbesserung der Biomineralisierung durch die Erhöhung der Calciumquelle beobachten, weswegen dieses optimierte Medium für die Versuche verwendet wurde. Die Bakterien wurden zuerst in 5 ml 4xmB4-Medium über Nacht bei 170 rpm und 30 °C inkubiert und am nächsten Tag die OD₆₀₀ bestimmt. Ab einer OD₆₀₀ von über 0,2 wurde die Bakteriensuspension sukzessiv mit frischem Medium verdünnt und anschließend 100 µl der Verdünnung auf eine 4xmB4-Agarplatte ausplattiert. Zum Schutz vor Evaporation wurden die Platten mit Parafilm verschlossen und für mind. zwei Wochen bei 30 °C gelagert. Nach der Inkubationszeit wurden die Platten, wie in Abbildung 6 dargestellt, makro- und mikroskopisch auf Kristallisierung untersucht.

2. Material und Methoden

Tabelle 17: Zusammensetzung des 4 x mB4-Mediums. Das Medium basiert auf dem bekannten B4-Medium (Boquet et al., 1973) und beinhaltet die vierfache Menge an Calciumacetat, um die Mineralisierung zu verstärken. Nach drei Wochen bei 30 °C wurden die Platten makro- und mikroskopisch auf Kristallbildung untersucht.

4 x mB4-Medium (Daskalakis et al., 2013)	pH 8,0
Bacto-Pepton	14,4 g
Ca(CH ₃ COO) ₂ x H ₂ O	10 % (w/v)
dH ₂ O	ad. 1 l
optional: Agar	18 g

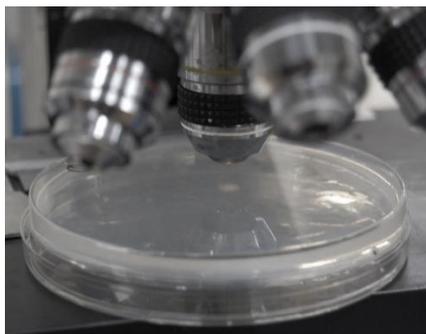


Abbildung 6: Mikroskopische Untersuchung der Agarplatte. Die Platte wurde auf dem Deckel auf den Objektisch gelegt und mit einer 10- und 40-fachen Vergrößerung untersucht.

2.9. Raman-Spektroskopie

2.9.1. Raman-Effekt

Die Raman-Spektroskopie ist ein Messverfahren, das auf dem Effekt inelastischer Streuung von Licht an Materie beruht. Hierbei wird ein Laser als monochromatische Anregungsquelle genutzt, die Licht einer bestimmten Wellenlänge abgibt und die bestrahlten Moleküle in Schwingungen versetzt. Das Laserlicht geht zu einem großen Teil unverändert durch das Molekül hindurch (*Ra-yleigh-Streuung*), ein kleinerer Teil jedoch wird durch die spezifische Schwingungsbewegung abgelenkt. Durch die zugeführte Energie in Form eines Photons wird die natürliche Schwingungsfrequenz des Moleküls erhöht. Nach einer gewissen Zeit wird dieses Photon wieder abgegeben und das Molekül in seinen Grundzustand zurückversetzt (Stokes-elastische Streuung). Selten kann es bei diesem Prozess auch zu einer inelastischen Streuung kommen, was bedeutet, dass das Molekül durch die Abgabe des Photons ein anderes Energielevel aufweist, als im eigentlichen Grundzustand. Dabei wird zwischen zwei Fällen unterschieden, dem Stokes- und Anti-Stokes-Übergang, der in Abbildung 7 dargestellt ist.

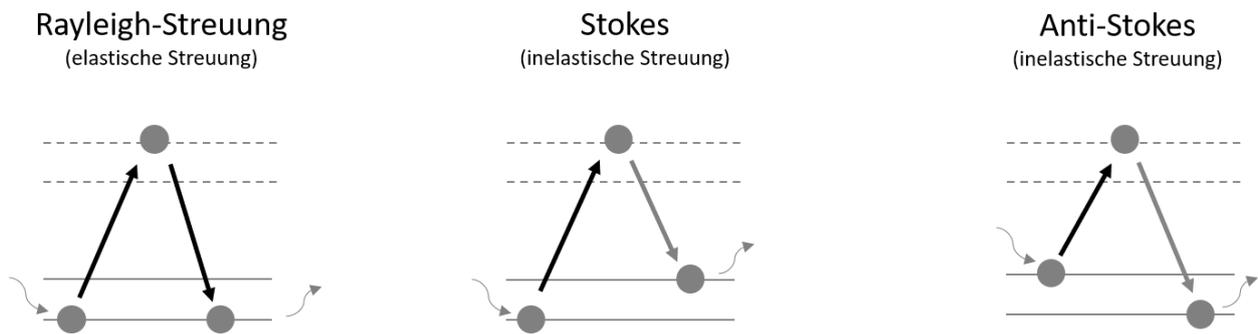


Abbildung 7: Graphische Darstellung des Grundprinzips der RAMAN-Spektroskopie. Mithilfe eines Lasers werden Oberflächen bestrahlt, wodurch Moleküle in höhere Energielevel versetzt werden. Nach einiger Zeit wird die Energie wieder freigesetzt und das Molekül liegt in seinem energetischen Grundzustand vor (elastische Streuung). In dem Fall, dass das ursprüngliche Energielevel über- (Stokes) oder unterschritten (Anti-Stokes) wird, handelt es sich um inelastische Streuung.

Der Unterschied im Energielevel der eingestrahlichten und wieder abgestrahlten Photonen kann von einem Detektor gemessen werden. Die Schwingung ist charakteristisch für das Molekül und kann als eine Art Fingerabdruck genutzt werden, um das Molekül zuzuordnen. Die einzelnen Fingerabdrücke ermöglichen dann die Analyse des Aufbaus oder der Struktur von Gasen, Flüssigkeiten oder Feststoffen.

2.9.2. Raman-Spektrometer

Für die Versuche in dieser Arbeit wurde ein konfokales Horiba LabRAM HR Evolution Raman Spektrometer, ausgestattet mit einem Olympus BX-FM Mikroskop, am Institut für Geowissenschaften und Meteorologie (Abteilung: Geochemie/Petrologie) verwendet. Als Anregungsquelle diente ein 2W Nd:YAG-Laser (532,09 nm) mit einer Energie von 10 mW auf der Probenoberfläche. Ein CCD-Detektor (Charge-Coupled Device) detektierte das gestreute Licht in einem Spektralbereich von 100 bis 1150 cm^{-1} . Die Belichtungszeit und die Akkumulation variierten von 2 - 6 s und 4 - 6 s. Die Raman-Spektroskopie wurde hauptsächlich dafür verwendet, die Mineralien, die von den Bakterien auf dem speziellen 4xmB-Medium gebildet wurden, auf ihre Zusammensetzung hin zu untersuchen.

2.10. Differenzierung von toten und lebenden Zellen (RNA-Isolation)

Die Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaft in den verschiedenen Versuchsaufbauten wurde über längere Zeiträume untersucht. Innerhalb dieser Zeitspannen können bakterielle

Gruppen, die zu Beginn dominieren, absterben. Die DNA dieser toten Zellen (eDNA) liegt weiter in der Probe vor und kann zu einer Überbewertung der Diversität und der Verteilung einzelner Gruppen in der Analyse führen (Li *et al.*, 2017). Da in einer klassischen PCR nicht zwischen der DNA von lebenden Zellen (dormante, wachsende und nicht-wachsende metabolisch aktive Zellen) und eDNA unterschieden wird, sollte der Einfluss dieser eDNA auf die relative Verteilung der Mikroorganismen innerhalb einer Probe untersucht werden. Zu diesem Zweck wurde die DNA und die RNA in einer Probe verglichen. Die RNA, die von metabolisch aktiven und dormanten Zellen synthetisiert wird, wird innerhalb kürzester Zeit in der Umwelt zersetzt, wohingegen DNA deutlich längere Zeitabschnitte überdauern kann (Nielsen *et al.*, 2007).

Die Aufreinigung der RNA wurde mit dem Monarch RNA Miniprep Kit (New England Biolabs GmbH, Frankfurt, DE), die DNA-Extraktion mit dem ZymoBIOMICS DNA Miniprep Kit (Zymo Research, Irvine, USA) durchgeführt. Zur Vorbereitung der Aufreinigungen wurde als Triplikat je ein eingeschläferter Flusskrebs in einem Falcon mit 30 ml dH₂O für 5 Tage bei 4 °C inkubiert. Für die Behandlung der RNA wurden alle Glasgefäße und Metallgeräte bei 200 °C für mind. 6 h sterilisiert. Am Versuchstag wurde der Arbeitsplatz mit Frekanol, DNA-Exitus und 0,5 M NaOH gereinigt, um alle Kontaminationsmöglichkeiten und einen Abbau der fragilen RNA durch externe RNasen zu minimieren. Ein RNase-freies Bead Beating Gefäß wurde mit sechs sterilen Keramikbeads (Ø 2,8 mm, Bertin Technologies SAS, Montigny-le-Bretonneux, FR) und 500 µl Protection Reagent (New England Biolabs GmbH, Frankfurt, DE) befüllt. Danach wurde das Krebsgewebe entnommen und in das Bead Beating Gefäß überführt. Zur Homogenisation des Gewebes wurden die Tubes bei 5.000 x g, 2 x 30 s, 20 s Pause bei RT in einem Precellys Tissue Homogenizer (Bertin Technologies SAS, Montigny-le-Bretonneux, FR) homogenisiert. Anschließend wurde die Hälfte der Probe für die DNA-, die andere Hälfte für die RNA-Aufreinigung verwendet. Die DNA-Aufreinigung wurde wie unter Abschnitt 2.7.3. beschrieben, durchgeführt. Bei der RNA-Aufreinigung wurde das homogenisierte Gewebe in ein neues Bead Beating Gefäß überführt. Für die Zellyse wurden Glasbeads (Ø 0,1 mm, Bertin Technologies SAS, Montigny-le-Bretonneux, FR) und zusätzlich 300 µl Protection Reagent zugegeben. Dann konnten die Zellen bei 6.000 x g, 3 x 60 s, 120 s Pause aufgeschlossen werden. Im Anschluss daran wurde die Probe für 2 min bei 16.000 x g bei 4 °C zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Die gleiche Menge Überstand wurde mit Lysis-Puffer ersetzt. Die restliche Aufreinigung wurde wie vom Hersteller empfohlen durchgeführt. Die Elution der RNA erfolgte in 40 µl RNase freiem Wasser. Nach der Messung der RNA-Konzentration mit dem Mikrovolumen-UV/VIS-Spektralphotometer NanoDrop™ One^C (Thermo

2. Material und Methoden

Fisher Scientific, Waltham, USA), wurde die Probe auf DNA-Rückstände überprüft. Hierfür wurde eine PCR des 16S-rRNA-Gens durchgeführt (siehe Abschnitt 2.6.3.). In dem Fall, dass noch DNA in der Probe vorlag, wurde ein weiterer Verdau mit DNase I (1 U/ μ l, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) angeschlossen. DNA-freie RNA wurde in cDNA umgeschrieben. Da RNA sehr instabil ist, sollte die Umschreibung innerhalb von 24 h durchgeführt werden. Die cDNA wurde mit dem LunaScript® RT SuperMix Kit (New England Biolabs GmbH, Frankfurt, DE), allgemeinen Primern (Random Hexamers, New England Biolabs GmbH, Frankfurt, DE) und den in Tabelle 18 dargestellten Parametern synthetisiert.

Tabelle 18: Zusammensetzung des Ansatzes und des PCR-Programms zur Synthese der cDNA mit dem LunaScript® RT SuperMix Kit.

Ansatz cDNA-Synthese		
LunaScript® SuperMix		4 μ l
RNA		(bis 1 μ g)
RNase/DNase-freies Wasser		ad. 20 μ l

PCR-Programm cDNA-Synthese		
25 °C	2 min	
55 °C	10 min	1 x
95 °C	1 min	

Zur Testung der cDNA Synthese wurde erneut eine 16S-rRNA-PCR (siehe Abschnitt 2.6.3.) angesetzt. Hier sollte die umgeschriebene cDNA spezifisch amplifiziert werden. Sowohl die cDNA, als auch die DNA der Proben wurden zur 16S-Amplikon-Analyse an die Firma Molecular Research DNA (USA) gesendet (siehe Abschnitt 2.7.4.)

3. Ergebnisse

Der Einfluss mikrobieller Aktivität auf den Erhalt oder die Zersetzung von Weichgewebe wurde bisher experimentell kaum untersucht. Ob Weichgewebe gut erhalten bleibt und somit als Fossil die Jahrtausende überdauern kann, wird vermutlich durch die initialen Schritte innerhalb von wenigen Tagen oder Monaten entschieden. Hierbei sind minimale Veränderungen in der Umgebung richtungsweisend, da dadurch nicht nur die mikrobielle Aktivität verringert oder erhöht wird, sondern auch spezielle Stoffwechselwege der Bakterien, die beispielsweise zur Präzipitation von Mineralien führen können, angeregt werden. In vorherigen Experimenten konnten paläontologische Forschungsgruppen den Einfluss bestimmter abiotischer Faktoren auf den Verlauf des Abbaus untersuchen, jedoch wurde noch nie systematisch die Zusammensetzung der beteiligten mikrobiellen Gemeinschaft ermittelt. Mithilfe ausführlicher Mikrobiom-Analysen (16S-rRNA-Amplikon-Analysen) in artifiziellen Zerfallsexperimenten mit unterschiedlichen abiotischen Parametern sollten die Veränderungen in der bakteriellen Besiedelung und daraus resultierende Unterschiede im Zerfall oder der Präservierung von Weichgewebe untersucht werden. Um den Einfluss äußerer Faktoren zu minimieren, wurde im Vorfeld eine eigene Flusskrebs-Zucht mit der Spezies *C. diminitus* etabliert. Dadurch sollte das körpereigene Mikrobiom der Versuchstiere vergleichbar gehalten werden. Eine Alternative wäre der kommerzielle Erwerb der Flusskrebse gewesen, bei dem nicht hätte sichergestellt werden können, dass immer das gleiche Futter verwendet wurde und die Krebse in einer ähnlichen Umgebung (Zusammensetzung der Pflanzen, des Sediments oder des Wassers innerhalb der Aquarien) ohne die Gabe von Antibiotika aufgezogen wurden. All diese Faktoren haben einen potentiellen Einfluss auf das Mikrobiom des Tieres und können somit auch den Ausgang des Experimentes verändern.

Gleichzeitig sollten die eigentlichen Zerfallsexperimente aber auch in einem möglichst natürlichen Umfeld ablaufen. Zu diesem Zweck wurde in Vorversuchen ermittelt, welches Wasser in den Experimenten verwendet werden sollte. Da in ersten Versuchen mehrere bakterielle Genera nachgewiesen werden konnten, die sich als Symbionten in und auf Protozoen (eukaryotischen Einzellern) ansiedeln können, sollte getestet werden, ob eine Filtration des Wassers zur Entfernung von größeren Organismen nützlich sein könnte. Die Anwesenheit von Protozoen könnte ein Problem darstellen, da diese Organismen Bakterien von der Oberfläche der Versuchstiere abgrasen können, was den Versuchsablauf verändern würde.

3.1. Vorversuche

Für die Vorversuche wurden vier verschiedene Versuchsansätze vorbereitet (siehe Abbildung 8). Neben zwei verschiedenen Wasserquellen, natürlichem Seewasser und Aquarienwasser, wurde eine Filtration des Wassers zur Vorbehandlung untersucht. Es wurden jeweils Wassernullproben (Tag 1 und Tag 14) und Gewebepollen (Tag 7 und Tag 14)

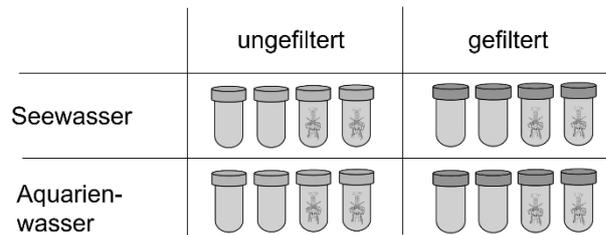


Abbildung 8: Versuchsaufbau der Vorversuche. Es wurden zwei verschiedene Wassersorten (Seewasser, Aquarienwasser) und eine vorgeschaltete Filtration zur Entfernung von Protozoen untersucht.

angesetzt und bis zur DNA-Extraktion am Versuchstag bei 30 °C inkubiert. Um das Mikrobiom aus dem Wasser aus den Nullproben isolieren zu können, wurde das Wasser über eine feinporige Membran (Porengröße: 0,45 µm) gefiltert. Die Bakterien sammeln sich auf dem Filter, der dann in die DNA-Extraktion eingesetzt wird. Die DNA des Weichgewebes konnte ohne zusätzliche Behandlung direkt aufgereinigt werden. Im Anschluss an die Extraktion wurde die DNA-Konzentration bestimmt (siehe Anhang: „Konzentration der extrahierten DNA - Vorversuche“) und eine 16S-Amplikon-Sequenzierung durchgeführt. Die Rohdaten wurden über die bioinformatische Pipeline ausgewertet und analysiert.

Insgesamt zeigten die Gewebepollen eine höhere DNA-Konzentration und auch die Qualität der aufgereinigten DNA, die sich anhand des Verhältnisses der Absorption bei 260 und 280 nm Wellenlänge bestimmen lässt, war deutlich besser. Die Sequenzierung der Proben war erfolgreich, das Rarefaction-Diagramm (siehe Anhang: „Rarefaction-Kurve Vorversuche“) verdeutlicht, dass die Proben tief genug sequenziert wurden, um die gesamte Bandbreite der mikrobiellen Diversität darstellen zu können. Wie in Abbildung 9 gezeigt, wiesen sowohl die Gewebe-, als auch die Wassernullproben im direkten Vergleich eine höhere Diversität bei der Verwendung von Seewasser auf. Der Shannon-Index wurde entwickelt, um neben der Anzahl der Taxa („Richness“), auch die gleichmäßige Verteilung („Evenness“) der Taxa innerhalb eines Mikrobioms zu untersuchen. Die Diversität der Gewebepollen, die in Aquarienwasser gelagert wurden, veränderte sich über den Zeitraum von 14 Tagen kaum und lag in allen Proben bei einem Shannon-Index unter 2,0.

3. Ergebnisse

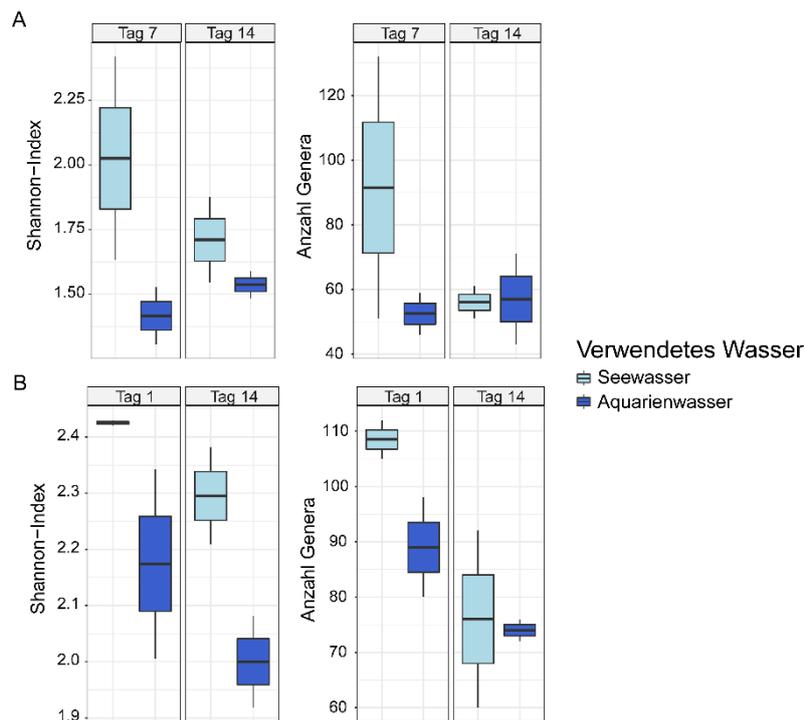
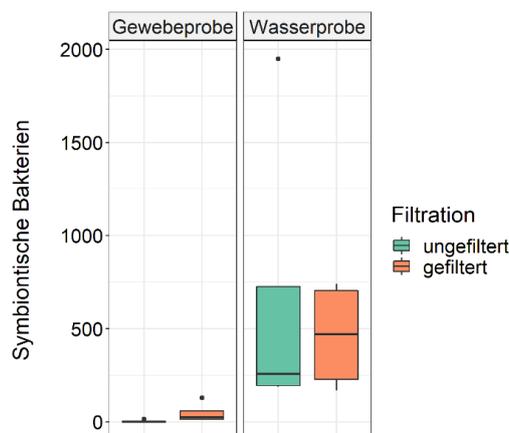


Abbildung 9: Vergleich der α -Diversität (Shannon-Index) und der Anzahl der Genera in den Vorversuchen. Das Gewebe wurde entweder in See- oder in Aquarienwasser für 7 bzw. 14 Tage bei 30 °C inkubiert. Es wurde sowohl die DNA der Gewebe-, als auch der Wasserproben extrahiert und analysiert. A) Diversitätsindizes der Gewebeproben. B) Diversitätsindizes der Wasserproben.

Die Diversität und die Anzahl der nachgewiesenen Genera in den Seewasserproben nahm innerhalb des Versuchszeitraumes von 14 Tagen ab. Diese Beobachtung lässt sich durch eine Abnahme an Nährstoffen und Sauerstoff mit der Zeit erklären. Bestimmte Bakterien sind an die Gegebenheiten besser angepasst, wodurch wenige Genera sich durchsetzen und das Habitat dominieren.

In den Vorversuchen wurde ebenfalls der Einfluss einer vorgeschalteten Filtration mit einer Porengröße von 0,45 mm zum Ausschluss eukaryotischer Einzeller untersucht. Einige Bakterien-spezies sind bekannt dafür als Symbionten auf Protozoen zu leben, sodass der Erfolg der Filtration anhand dieser Spezies bestimmt wurde. Die Gesamtanzahl der Sequenzen, die symbiontisch vorkommenden Genera zugeordnet werden konnte, ist in Abbildung 10 zu sehen. In den Gewebeproben, bei denen das Wasser nicht gefiltert wurde, lagen lediglich 15 entsprechende Sequenzen vor. Insgesamt wurden in dieser Probe 104.953 16S-rRNA-Amplikons analysiert. Bei den Proben, die in gefiltertem Wasser gelagert wurden, war die Anzahl der symbiontisch lebenden Genera ebenfalls gering. Auf 72.434 Gesamtsequenzen konnten nur 189 Sequenzen dieser Gruppe zugeordnet werden.

3. Ergebnisse



	Gewebeproben		Wasserproben	
	unfiltriert	gefilitert	unfiltriert	gefilitert
Anzahl an Reads der symbiontisch lebenden Genera	15	189	2653	1849
Gesamtanzahl Reads	104.953	72.434	53.056	48.803

Abbildung 10: Analyse der Effizienz eines vorgeschalteten Filtrationsschrittes zur Entfernung von Protozoen. Da die 16S-Amplikon-Analyse keine Aussage über die Anzahl der Protozoen macht, wurden stattdessen die Sequenziersignale (Reads), die symbiontischen Bakterien zugeordnet werden konnten, betrachtet.

In den Wasserproben war die Anzahl leicht höher mit 2.653 bzw. 1.849 Sequenzen symbiontischer Bakterien auf 53.056 bzw. 48.803 Gesamtsequenzen. Beide Vergleiche zeigen keinen großen Einfluss einer vorgeschalteten Filtration auf die Anzahl möglicher Symbionten. Mit und ohne Vorbehandlung lag die Anzahl dieser speziellen Bakterien in einem vergleichbaren Rahmen. Die Gewebeprobe im unfiltrierten Wasser lassen außerdem vermuten, dass der Einfluss möglicher Protozoen, angezeigt durch ihre Symbiosepartner, vernachlässigbar ist. Da die symbiontischen Bakterien in der Lage sind, auch außerhalb der Protozoen zu leben, lässt sich nicht ausschließen, dass sich der Filtrationsprozess trotzdem auf die Anzahl der eukaryotischen Einzeller auswirkt.

Da die Versuche in möglichst natürlichem Medium durchgeführt werden sollten, um vielfältige Stoffwechselwege und bakterielle Interaktionen zu begünstigen, wurde für die geplanten Versuchsreihen mit dem Seewasser aus einem See in Bonn-Röttgen weitergearbeitet. Der Filtrationsschritt wurde in den Versuchsreihen nicht durchgeführt, da die Ergebnisse der Vorversuche gezeigt haben, dass mit und ohne Vorbehandlung kein signifikanter Unterschied in der Anzahl der symbiontisch lebenden Bakterien vorlag.

3.2. Kontrollen zum Kit

Im Vorfeld der Analyse der 16S-rRNA-Amplikons innerhalb einer Probe steht die Extraktion der bakteriellen DNA. Gemeinsam mit der Vorbereitung und Durchführung der Sequenzierung stellt dieser Schritt eine der großen Fehlerquellen innerhalb der Analyse des Mikrobioms dar. Die einzelnen Bakterien weisen große Unterschiede in ihrem Aufbau auf, wobei vor allem die verschiedenen Zellmembranen und ihre Zusammensetzung einen Einfluss auf den Aufreinigungsprozess haben können. Kann die Zellmembran nicht richtig lysiert werden, wird keine DNA freigesetzt und das Bakterium wird in der Analyse der Bakteriengemeinschaft nicht betrachtet. Wichtige bakterielle Gruppen könnten so ausgeschlossen und ihr Einfluss auf gewisse Prozesse unterschätzt werden. Aus diesem Grund sollte im Vorfeld einer 16S-rRNA-Amplikon-Studie immer das Protokoll, welches zur Extraktion der DNA verwendet wird, mithilfe einer bekannten mikrobiellen Gemeinschaft („Mock“) getestet werden. Für die Mock-Analyse wurde der ZymoBIOMICS Microbial Community Standard verwendet, der eine genaue Zusammensetzung aus acht verschiedenen Bakterienspezies aufweist (siehe Tabelle 8). Hierbei handelt es sich sowohl um Gram-positive, als auch Gram-negative Organismen, die aufgrund ihrer Unterschiede im Aufbau ihrer Zellmembran einfacher oder schwieriger zu lysieren sind. In Abbildung 11 sind Ergebnisse der Sequenzierung der Triplikate dargestellt. Während die Proben 1 und 3 eine vergleichbare Verteilung der acht verschiedenen Bakterien zeigten, war die bakterielle Zusammensetzung des Replikats 2 deutlich anders. Dieses Beispiel macht deutlich, dass alle Analysen mit mindestens drei Replikaten durchgeführt werden sollten, um einen Bias zu vermeiden. Probe 2 wird aus den weiteren Beschreibungen und Interpretationen ausgeschlossen. Leichte Unterschiede zwischen den Proben 1 und 3 waren beim Genus *Lactobacillus* nachweisbar. Während die Genera *Pseudomonas*, *Salmonella* und *Enterococcus* die ideale Verteilung nahezu abbildeten, wichen die restlichen Genera in ihrer Häufigkeit unterschiedlich stark vom Standard ab. Vertreter der Genera *Listeria* und *Bacillus* wurden in ihrer Häufigkeit überschätzt. Die nachgewiesene Menge an *Bacillus* sp. lag erkennbar oberhalb der idealen Verteilung (Distanz Probe 1: 6,92; Distanz Probe 2: 8,92).

3. Ergebnisse

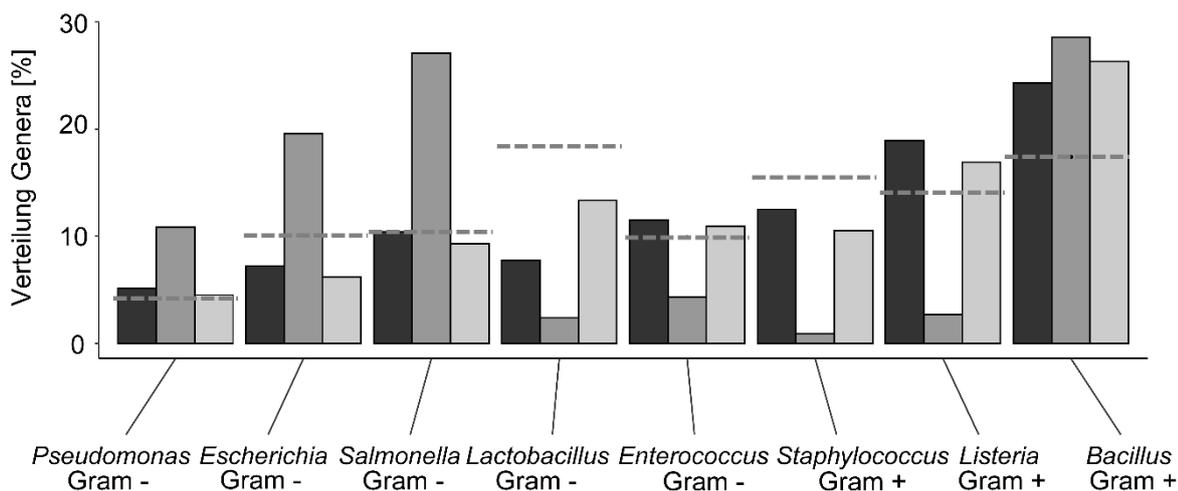


Abbildung 11: Prozentuale Verteilung der einzelnen Genera in der bekannten, mikrobiellen Gemeinschaft (ZymoBIOMICS Microbial Community Standards). Der Standard ist auch acht verschiedenen Bakterienspezies zusammengesetzt, die aufgrund ihrer Zellwandzusammensetzung ein unterschiedliches Lyseverhalten aufweisen. Die rote Linie zeigt die ideale Häufigkeit (%) der 16S-Amplikons der einzelnen Genera, wie vom Hersteller angegeben.

Im Gegensatz dazu scheint das Kit Schwierigkeiten zu haben Spezies der Genera *Escherichia* sp., *Lactobacillus* sp. und *Staphylococcus* sp. zu lysieren. Hier war die nachgewiesene Menge teils deutlich unterhalb der erwarteten Häufigkeit, wobei die größte Differenz zur idealen Verteilung beim Genus *Lactobacillus* vorlag (Distanz Probe 1: -10,67; Distanz Probe 2: -5,06). Neben den acht bekannten Genera konnten zusätzlich zehn weitere Genera in den Proben nachgewiesen werden. Allerdings machte die Menge dieser Genera unter 1 % der gesamten Zusammensetzung aus. Lediglich Spezies des Genus *Enterobacter* sind auch bis zu 3,5 % vertreten. Da diese ungewollten Kontaminationen an verschiedenen Stellen der Probenaufbereitung eingeführt werden und Einfluss auf die Interpretation der Ergebnisse haben können, wurde bei den nachfolgenden Analysen ein Schwellenwert von 0,5 % gesetzt.

Zusätzlich zu der Mock-Analyse wurden ebenfalls Replikate einer Leerprobe überprüft, um den Eintrag von Kontaminationen über die Puffer oder andere Bestandteile des Aufreinigungs- und Sequenzierprozesses zu untersuchen. Insgesamt konnten in den Triplikaten 16S-rRNA-Genkopien von bis zu 32 verschiedenen Genera nachgewiesen werden. Diese zeigten zum Teil jedoch sehr geringe Mengen an Sequenziersignalen (Reads). Nach dem Filtern aller Genera, die über 100 Reads gezeigt haben, verringerte sich die Anzahl auf 22 Genera. Hierbei dominierten, wie in Abbildung 12 aufgezeigt, fünf verschiedenen Genera.

3. Ergebnisse

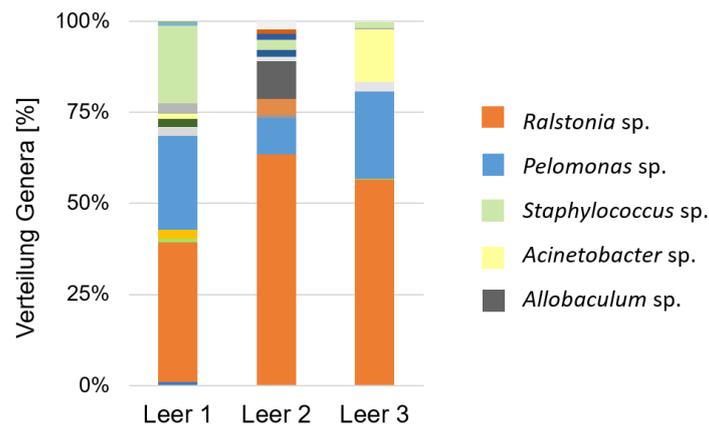


Abbildung 12: Prozentuale Verteilung der Genera in den Leerproben. Bei den Leerproben wurde anstelle von Gewebe DNase/RNase-freies Wasser auf die Säule aufgetragen und die DNA extrahiert, um den Eintrag von Kontaminationen durch Chemikalien oder andere Bestandteile des Extraktionsvorgangs zu überprüfen.

In allen drei Replikaten lag vor allem eine große Menge an *Ralstonia* sp. und *Pelomonas* sp. vor. In Probe 1 konnte zusätzlich *Staphylococcus* sp. nachgewiesen werden, während die Proben 2 und 3 noch Spezies der Genera *Allobaculum* sp. oder *Acinetobacter* sp. aufwiesen. Diese Genera scheinen an einer Stelle der Probeaufbereitung eingeführt worden zu sein. Neben den *Enterobacter* sp., die eine deutliche Verunreinigung in der Mock-Analyse dargestellt haben, sollten auch die zuvor genannten Genera in den folgenden 16S-Amplikon-Analysen kritisch betrachtet werden.

3.3. Versuchsreihen

Bakterien können aufgrund ihrer speziellen Eigenschaften vielfältige Rollen beim Zerfall und einem möglichen Erhalt von Weichgewebe spielen. Neben der Exkretion einer großen Anzahl an degradierenden Exoenzymen, sind sie ebenfalls in der Lage, durch ihre metabolische Aktivität die chemischen Bedingungen der Umgebung so zu verändern, dass eine Stabilisierung und potentielle Mineralisierung des Gewebes ermöglicht wird. In der paläontologischen Wissenschaft wird der große Einfluss der Bakterien für die der Fossilisation längst anerkannt, allerdings fehlen bisher mikrobiologische Studien, die sich auf die einzelnen Bakterien und ihren speziellen Beitrag zu den Prozessen konzentriert haben. Moderne Techniken, wie das Next-Generation-Sequencing, ermöglichen in größerem Maßstab eine Analyse der 16S-rRNA-Amplikons und somit die detaillierte Untersuchung der Veränderungen der bakteriellen Zusammensetzung über die Zeit. In diesem Projekt wurde der Einfluss verschiedener abiotischer Faktoren auf die bakterielle Gemeinschaft und ihre metabolische Aktivität in mehreren Zerfallsexperimenten untersucht. Als Studienorganismus

3. Ergebnisse

wurde der Flusskrebs *Cambarellus diminutus* verwendet. Neben der Temperatur (4 °C und 24 °C) und dem Sauerstoffgehalt zu Beginn des Experimentes (aerob und anaerob) wurde ebenfalls das Mikrobiom des verwendeten Wassers verändert (unbehandelt und autoklaviert/steril). In Tabelle 19 sind die einzelnen Versuchsreihen und die verwendeten abiotischen Parameter aufgeführt. Die Dauer der Zerfallsexperimente wurde unter kalten Bedingungen verlängert, da Vorversuche bei 6 °C und 30 °C eine Verlangsamung der Prozesse aufgezeigt haben.

Tabelle 19: Übersicht über die abiotischen und biotischen Parameter der Versuchsreihen. *beschrieben ist der Sauerstoffgehalt zu Beginn der Versuchsreihen. Mithilfe spezieller Gaserzeugungssystemen wurde der Sauerstoff aus den Behältnissen verdrängt.

Abk.	Reihe	Parameter			Dauer
		Temperatur	Sauerstoffgehalt*	Mikrobiom des Wassers	
V1	1	24 °C	aerob	unbehandelt	21 Tage
V2	2	24 °C	aerob	steril	21 Tage
V3	3	4 °C	aerob	unbehandelt	104 Tage
V4	4	4 °C	aerob	steril	104 Tage
V5	5	24 °C	anaerob	unbehandelt	21 Tage
V6	6	24 °C	anaerob	steril	21 Tage
V7	7	4 °C	anaerob	unbehandelt	104 Tage
V8	8	4 °C	anaerob	steril	104 Tage

An den Versuchstagen (siehe Abbildung 4) wurde der Flusskrebs entnommen, die optischen Veränderungen dokumentiert und die DNA des gesamten Tieres mithilfe eines Kits extrahiert. Zusätzlich zu den Gewebeproben, wurde an verschiedenen Tagen auch eine Wassernullproben (siehe Anhang: „Balkendiagramme Wassernullproben“) ohne Gewebe analysiert. Nach der Extraktion wurde die DNA-Konzentration und -Qualität überprüft (siehe Anhang: „DNA-Konzentration der extrahierten DNA - Versuchsreihen“). Die Amplifikation der 16S-Genregion und die Sequenzierung dieser Amplikons wurde von einem externen Dienstleister durchgeführt.

3.3.1. Qualität der Sequenzierungen

Die Rohdaten der Sequenzierung wurden mithilfe einer bioinformatischen Pipeline mit dem Programm QIIME2 und verschiedenen Paketen in R ausgewertet. An verschiedenen Schritten innerhalb der Prozessierung lässt sich die Qualität der Sequenzierungsergebnisse untersuchen und anhand von Entscheidungspunkten optimieren. Nach dem Import der Daten und dem Abschneiden der Sequenzierprimer und anderen Erkennungssequenzen, kann die Qualität der Daten überprüft

3. Ergebnisse

werden. Oftmals nimmt die Qualität der Sequenzierung im hinteren Bereich der Sequenz ab, da die Sequenzierchemie limitiert ist. Die Sequenzen dieser Versuchsreihen zeigten hohe Qualitätswerte bis zu einer Länge von 180 - 200 bp. Aus diesem Grund wurden die Sequenzen im nächsten Schritt bei der entsprechenden Länge gekürzt. Im folgenden Prozess wurden die Vorwärts- und Rückwärtssequenzen übereinander gelagert und die resultierenden Sequenzen miteinander abgeglichen, sodass sie in Amplicon-Sequenzier-Varianten (Amplicon Sequencing Variants, ASV) eingeteilt werden konnten. Zusätzlich dazu wurden potentielle Artefakte (z.B. Chimeren) herausgefiltert (siehe Anhang: „Statistik über die Sequenzierdaten“). Diesen Prozess sollten mindestens 50 % der Sequenzen pro Probe überstehen. In diesem Datensatz lagen lediglich 13 von 284 Proben unterhalb des Schwellenwertes von 50 %. Es kann vermutet werden, dass bei diesen Proben die Qualität der Sequenzierungsergebnisse schlecht war, weswegen die Ergebnisse dieser Proben mit Vorsicht interpretiert werden sollten. Wie in Tabelle 20 dargestellt konnten 68.524 verschiedene ASVs nachgewiesen werden, die eine durchschnittliche Länge von 257,81 bp aufgewiesen haben.

Tabelle 20: Übersicht über die Anzahl und Länge der ASVs, die mit den Rohdaten der acht Versuchsreihen generiert werden konnten. bp = Basenpaare

Statistik	Wert
Minimum	180 bp
Maximum	367 bp
Mittelwert	257,81 bp
Standardabweichung	13,56 bp
Anzahl Sequenzen	68.524

Bei jeder Probe sollte zudem überprüft werden, ob die Sequenzierung die gesamte Bandbreite der Diversität abbilden konnte. Dies lässt sich über eine Analyse der Sequenziertiefe nachweisen („Rarefaction-Kurve“). Bei einer Rarefaction-Kurve wird über zufällige Stichproben, die durchschnittliche Menge an vorgefundenen ASVs oder der durchschnittliche Shannon-Index in den Proben gegen die Sequenziertiefe dargestellt. Sobald die Kurve eine Sättigung erreicht, wurde die Probe tief genug sequenziert und die gesamte Variation innerhalb der Probe wird gezeigt. Die Rarefaction-Kurve, die in Abbildung 13 dargestellt ist, weist eine solche Sättigung auf. Dementsprechend kann davon ausgegangen werden, dass die Ergebnisse der Sequenzierung die Diversität der Probe gut wiedergeben.

3. Ergebnisse

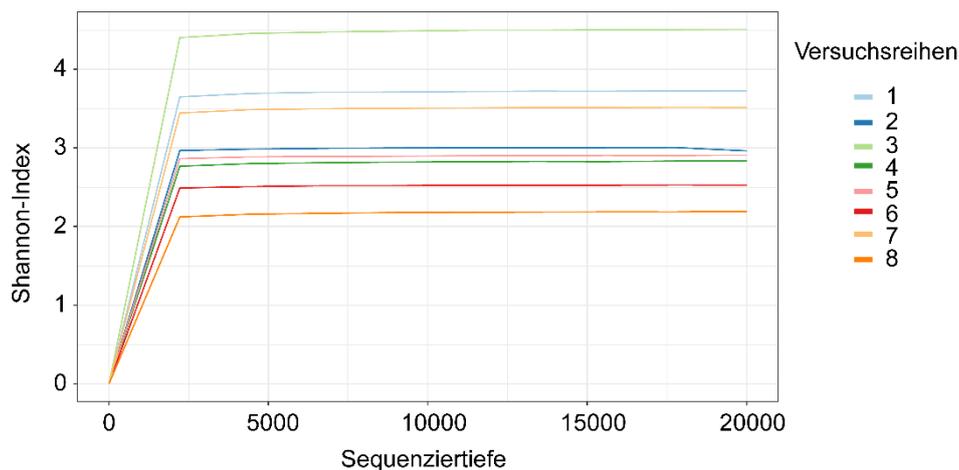


Abbildung 13: Rarefaction-Kurve zur Analyse der Sequenziertiefe anhand der α -Diversität (Shannon-Index). Sobald die Proben eine Sättigung erreichen, kann davon ausgegangen werden, dass das gesamte Spektrum der Diversität durch die Ergebnisse der Sequenzierung abgebildet wird.

Ein wichtiger Aspekt bei der Analyse der Proben ist eine gleichmäßige Anzahl an Sequenzen, da ansonsten durch eine ungleiche Verteilung künstlich Unterschiede zwischen den Proben eingeführt werden können. Dieses Problem kann dadurch umgangen werden, dass alle Proben auf die gleiche Sequenziertiefe normalisiert werden. Für die Berechnung der Diversitätsindizes wurden aus diesem Grund alle Proben auf die niedrigste Sequenziertiefe eingestellt.

Im Anschluss an die Qualitäts- und Zuordnungsschritte können die ASVs mit der Datenbank SILVA abgeglichen und dadurch bekannten 16S-Gensequenzen zugeteilt werden. Die taxonomische Zuordnung liefert Informationen über die Einordnung in den phylogenetischen Baum und in die unterschiedlichen Taxa. Auf Basis dieser Daten können dann im Anschluss die Veränderungen in der mikrobiellen Gemeinschaft innerhalb der Versuchsreihen detektiert und analysiert werden. Bei der Analyse mikrobieller Gemeinschaften sollten immer mehrere biologische Replikate mitgeführt werden, um ein zufälliges Ergebnis ausschließen zu können. Da in diesen Versuchen mit Flusskrebsen gearbeitet wurde und diese eine ganz individuelle Besiedelung aufweisen können, ermöglicht die Verwendung von Replikaten die Analyse von Tendenzen. Allerdings sollte die bakterielle Zusammensetzung der Replikate vergleichbar sein, um gemeinsame Aussagen treffen zu können. Außerdem sollte beachtet werden, dass diese biologischen Replikate individuell und nicht als gemittelte Werte dargestellt werden müssen. Ein Vergleich der Replikate, um eine zufällige Verteilung ausschließen zu können, wurde mithilfe einer PERMANOVA-Analyse (Permutational analysis of variance) durchgeführt (siehe Tabelle 21; Huson *et al.*, 2017). Hierbei wird die mittlere Quadratsumme zwischen den einzelnen Replikaten eines Probenortes mit der Summe

3. Ergebnisse

zwischen den Probestagen verglichen. Ein p-Wert unterhalb von 0,05 zeigt, dass die Replikate untereinander sehr ähnlich sind, verglichen zu den unterschiedlichen Probestagen.

Tabelle 21: Ergebnisse der PERMANOVA-Analyse. Durch den Vergleich der mittleren Quadratsummen der einzelnen Replikate untereinander und zwischen den Probestagen kann untersucht werden, ob die Triplikate ähnlich sind und keine zufällige Verteilung vorliegt.

Versuchsreihe	Teststatistik PERMANOVA			
	Mittlere Quadratsummen		p-Wert	Signifikanz
	innerhalb	zwischen		
1	0.143	1.783	0.000999	***
2	0.142	1.248	0.000999	***
3	0.142	1.397	0.000999	***
4	0.146	1.12	0.004995	**
5	0.102	3.15	0.000999	***
6	0.16	1.655	0.000999	***
7	0.103	0.989	0.000999	***
8	0.13	0.649	0.02298	*

In allen Versuchsreihen ist die mittlere Quadratsumme der einzelnen Replikate deutlich niedriger als die mittlere Quadratsumme zwischen den Probestagen, was bestätigt, dass die biologischen Replikate sehr ähnlich sind. Die Nullhypothese, dass die bakterielle Zusammensetzung aller Proben unabhängig von den Probestagen und zufällig ist, kann abgelehnt werden. Lediglich die Versuchsreihen 4 und 8 zeigen schwächere Signifikanzen, was anhand der bakteriellen Verteilung erklärt werden kann. In beiden Versuchsreihen wurde das Mikrobiom ab Versuchstag 21 in Versuchsreihe 4, beziehungsweise Versuchstag 14 in Versuchsreihe 8, von einer einzelnen Spezies dominiert, wodurch die Unterschiede zwischen den Versuchstagen verringert werden.

3.3.2. Ausgangssituation der Versuchsreihen

Innerhalb der Versuchsreihen gibt es zahlreiche Parameter, die die mikrobielle Gemeinschaft beeinflussen könnten. Neben den technischen Kontrollen (siehe Abschnitt 3.2.), sollten auch die biologischen Parameter durch mehrere Kontrollproben überwacht werden. Da die Versuche möglichst naturnah durchgeführt werden sollten, wurde natürliches Seewasser und Sediment verwendet. Die mikrobielle Zusammensetzung dieser beiden Komponenten kann allerdings jahreszeitlichen Schwankungen unterliegen und so eine unkontrollierbare Verschiebung der bakteriellen

3. Ergebnisse

Gemeinschaft zur Folge haben. Um das Ausmaß der Veränderung zu untersuchen, wurde sowohl vom Sediment (Frühling, Sommer, Herbst, Winter), als auch vom Wasser zu bestimmten Jahreszeiten (Frühling, Sommer, Herbst) die bakterielle DNA in Triplikaten extrahiert und die Proben auf die bakterielle Zusammensetzung untersucht. Die Wassernullproben an Tag 1 variierten deutlich zwischen den Versuchsreihen (Abbildung 14).

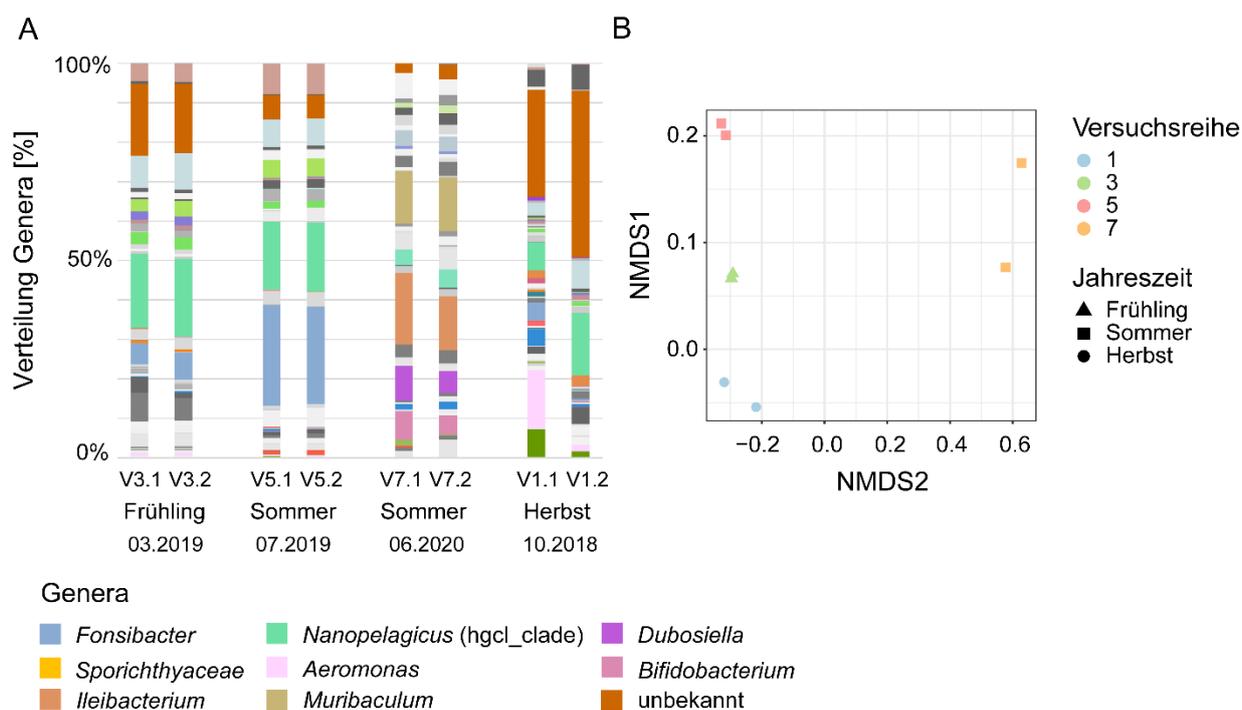


Abbildung 14: Mikrobielle Verteilung in den Wassernullproben an Tag 1. Um den jahreszeitlichen Einfluss auf die bakterielle Gemeinschaft des Wassers zu überprüfen, wurden im Frühling (2019), Sommer (2019, 2020) und Herbst (2018) Nullproben analysiert. A) Prozentuale Verteilung der Genera in den Nullproben. Zur Übersichtlichkeit sind lediglich die häufigsten Genera in der Legende dargestellt. B) Verteilung der Bray-Curtis-Distanzen des Mikrobioms der unterschiedlichen Wasserproben in einem NMDS-Graphen (Non-metric multidimensional scaling). Je weiter die Proben voneinander entfernt sind, desto unterschiedlicher ist die mikrobielle Zusammensetzung.

Während kein statistischer Zusammenhang zwischen den Jahreszeiten und der Bakteriengemeinschaft erkennbar war (Permanova: p-Wert 0,07), schienen die Unterschiede in der bakteriellen Zusammensetzung im Wasser anhand der Probennahme in verschiedenen Jahren statistisch erklärbar zu sein (Permanova: p-Wert 0,035). Das Wasser für die Versuchsreihen 3 und 5 wurde jeweils im Jahr 2019 abgefüllt. Diese beiden Proben ähnelten sich in ihrer Zusammensetzung (Bray-Curtis Distanz: ~ 0,4), wohingegen beide große Unterschiede zu den Wasserproben aufwiesen, die im Jahr 2018 und 2020 abgenommen wurden (Bray-Curtis Distanz: ~0,7 und ~0,9). Die bakterielle Gemeinschaft der Proben aus den Jahren 2018 und 2020 unterschied sich ebenfalls stark (Bray-Curtis Distanz ~ 0,95). Während das Wasser im Jahr 2019 in den Versuchsreihen 3 und 5 vor allem

3. Ergebnisse

von den Genera *Fonsibacter* sp., *Nanopelagicus* sp., *Planktophila* sp. und *Sediminibacterium* sp. dominiert wurde, waren die Wasserproben im Jahr 2018 besonders mit bisher nicht beschriebenen, unbekanntem Genera (23 und 39 %) besiedelt. Die Probe, die im Jahr 2020 abgefüllt wurde, wies große Anteile der Genera *Muribaculum* sp., *Ileibacterium* sp., *Dubosiella* sp. und *Bifidobacterium* sp. auf. Da innerhalb der einzelnen Jahre nicht alle Jahreszeiten beprobt wurden, lässt sich keine Aussage über einen jahreszeitlichen Zusammenhang treffen. Die großen Unterschiede in den Ausgangsproben sollten bei der Analyse der Sequenzierungsergebnisse der Gewebeproben mit einbezogen werden.

Im Gegensatz zu den Wasserproben zeigte das Sediment keine sichtbaren Schwankungen in der bakteriellen Zusammensetzung (siehe Abbildung 15), weder im jahreszeitlichen Verlauf noch zwischen unterschiedlichen Jahren. Aus diesem Grund kann nahezu ausgeschlossen werden, dass eine zeitliche Variation bei der Abnahme des Sediments Einfluss auf die Veränderungen der bakteriellen Gemeinschaft in den Versuchsreihen hat. Das Sediment wurde von den Genera *Prochlorococcus* sp., *Candidatus Accumulibacter* sp., *Candidatus Competibacter* sp. und zwei bisher unidentifizierten Genera der Chloroflexi (g_KD4-96) und Nitrosomonadaceae (g_966-1) dominiert. Zusätzlich dazu konnten zwischen 15 und 32 % der Sequenzen zu keinem bisher beschriebenen Genus zugeordnet werden.

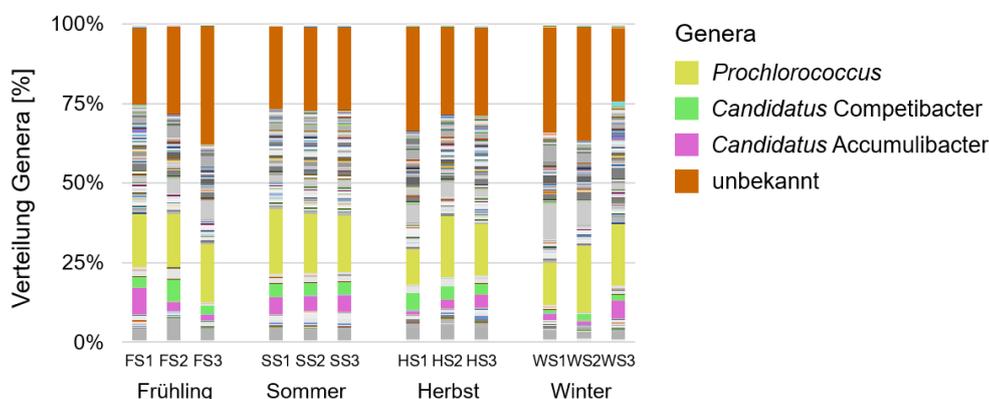


Abbildung 15: Prozentuale Verteilung der Genera im Sediment zu vier verschiedenen Jahreszeiten. Zur Übersichtlichkeit sind lediglich die häufigsten Genera in der Legende dargestellt

Im Vorfeld der Versuchsreihen wurde eine Flusskrebs-Zucht etabliert, um die intrinsische Flora der Krebse besser kontrollieren zu können. Äußere Faktoren wie Nahrung oder die Haltungsbedingungen bei der Aufzucht der Krebse können die bakterielle Besiedelung stark beeinflussen. Zu Beginn der einzelnen Versuchsreihen wurden deshalb jeweils drei Flusskrebse als Nullprobe untersucht. Die Versuchsreihen 7 und 8 wurden parallel angesetzt, weshalb für die Versuchsreihe 7

3. Ergebnisse

keine Daten erhoben wurden. Neben den in Tabelle 22 beschriebenen Genera, wurden alle Flusskrebse ebenfalls von einer größeren Anzahl (zwischen 2 - 29 %) an bisher nicht zugeordneten Genera besiedelt.

Tabelle 22: Übersicht über die dominierenden Genera in den Gewebeproben vor Beginn der Versuchsreihen. Zu diesem Zeitpunkt wurden alle Individuen vergleichbar behandelt. Sie wurden aus dem Aquarium entnommen, eingeschläfert und in sterilen Probenbehältern zum Institut für medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Parasitologie transportiert. Die Versuchsreihen 7 und 8 wurden gleichzeitig angesetzt, weswegen für Versuchsreihe 7 keine Nullproben analysiert wurden.

Versuchsreihe	Dominierende Genera
1	<i>Lacihabitans</i> sp., <i>Hydrogenophaga</i> sp., <i>Candidatus Bacilloplasma</i> sp., <i>Aeromonas</i> sp.
2	<i>Lacihabitans</i> sp., <i>Candidatus Bacilloplasma</i> sp., <i>Aeromonas</i> sp.
3	<i>Rhodobacter</i> sp., <i>Nitrospira</i> sp., <i>Hydrogenophaga</i> sp., <i>Aeromonas</i> sp.
4	<i>Sphearotilus</i> sp., <i>Vogesella</i> sp., <i>Phreatobacter</i> sp., <i>Candidatus Bacilloplasma</i> sp.
5	<i>Lacihabitans</i> sp., <i>Hydrogenophaga</i> sp., <i>Flectobacillus</i> sp., <i>Pseudorhodobacter</i> sp., <i>Aeromonas</i> sp.
6	<i>Gordonia</i> sp., <i>Cnuella</i> sp., <i>Aeromonas</i> sp., <i>Candidatus Bacilloplasma</i> sp.,
8	<i>Candidatus Bacilloplasma</i> sp., <i>Mycobacterium</i> sp., <i>Flavobacterium</i> sp.

Das Mikrobiom der unterschiedlichen Tiere wies trotz der vergleichbaren Aufzucht eine große Variation auf (Abbildung 16). Der Unterschied bestand nicht nur zwischen den verschiedenen Zeitpunkten, sondern auch zwischen den biologischen Replikaten. Während die Gewebeproben der Versuchsreihen 1, 3, 5 und 6 relativ vergleichbar sind (Distanz zum Mittelwert der Reihe < 0,3), weisen die Versuchsreihen 2, 4 und 8 eine größere Variation in ihrem Mikrobiom auf (Distanz zum Mittelwert der Reihe > 0,3). Diese Beobachtungen zeigen deutlich, dass die intrinsische Flora neben den kontrollierbaren Parametern, auch von weiteren Faktoren geformt wird. Ein Einfluss der unterschiedlichen mikrobiellen Zusammensetzung der Individuen auf den Versuchsverlauf kann nicht ausgeschlossen werden und muss bei den weiteren Analysen mit einbezogen werden.

3. Ergebnisse

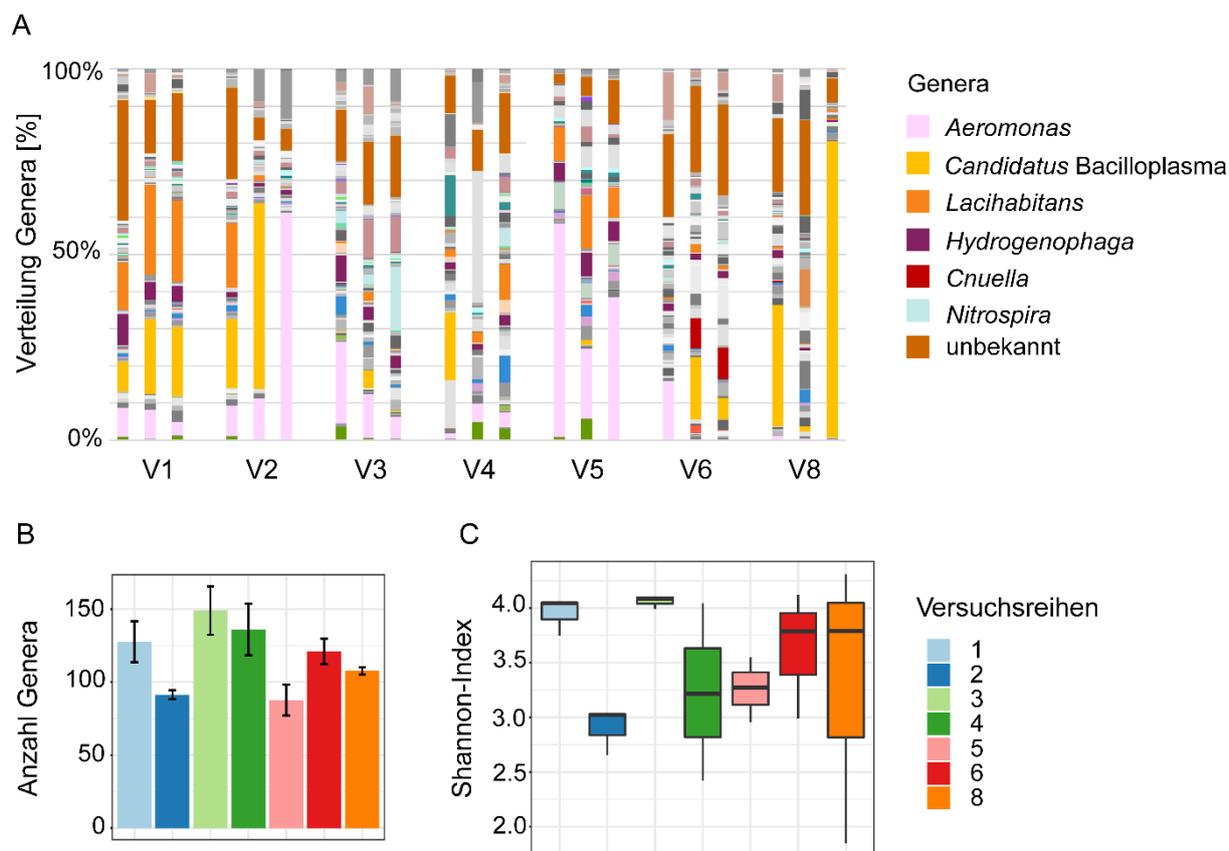


Abbildung 16: Mikrobielle Zusammensetzung in den Krebsproben an Tag 1. Zu diesem Zeitpunkt wurden alle Individuen vergleichbar behandelt. Die Versuchsreihen 7 und 8 wurden gleichzeitig angesetzt, weswegen für Versuchsreihe 7 keine Nullproben analysiert wurden. A) Prozentuale Verteilung der Genera in den Proben. Zur Übersichtlichkeit sind lediglich die häufigsten Genera in der Legende dargestellt. B) Anzahl der Genera in den verschiedenen Proben. In dieser Darstellung wurden die Triplikate gemittelt. C) α -Diversität (Shannon-Index) innerhalb der Gewebeproben.

3.3.3. Verlauf der mikrobiellen Gemeinschaft in den Versuchsreihen

Die einzelnen Untersuchungen der Versuchsreihen wurden im Zuge zweier Projekte durchgeführt. Die morphologischen Veränderungen der Flusskrebse im Zeitverlauf der Zerfallsexperimente und die Überwachung der abiotischen Faktoren wurde von Bastian Mähler im Institut für Geowissenschaften (Abteilung: Paläontologie) dokumentiert. Die detaillierten Ergebnisse sind in der entsprechenden Dissertation (Mähler, 2021) aufgeführt und werden in dieser Arbeit nur oberflächlich beschrieben. Bei den optischen Beobachtungen der Flusskrebse wurden bestimmte Organsysteme und Körperregionen speziell makro- und mikroskopisch untersucht und die Veränderungen notiert. Die entsprechenden Bereiche sind in Abbildung 17 aufgeführt. Sobald die Organe nicht mehr differenziert erkennbar waren, wurden sie als abgebaut bzw. zersetzt eingestuft.

3. Ergebnisse

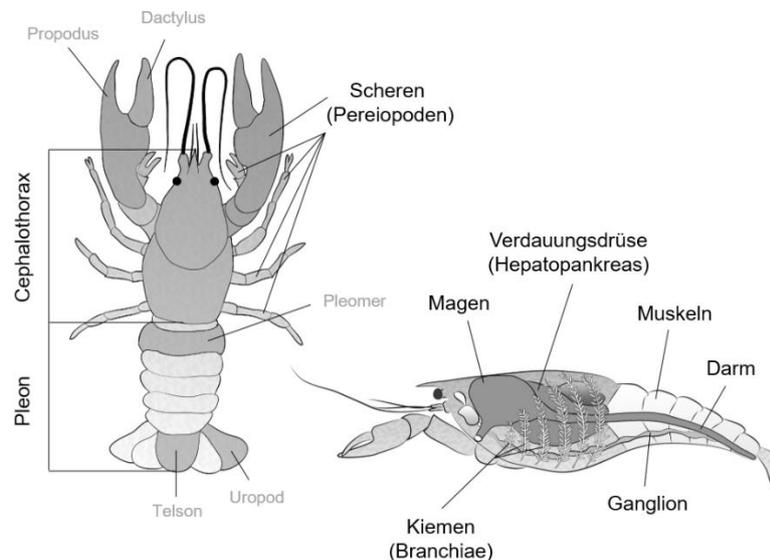


Abbildung 17: Schematische Darstellung der Körperteile und Organe eines Flusskrebse (angepasst von Mähler, 2021). Der Zerfall der schwarz geschriebenen Bereiche wurde ausführlich makro- und mikroskopisch dokumentiert. Die grau geschriebenen Bereiche sind zur Vollständigkeit dargestellt.

Die Vorbereitung und Durchführung der mikrobiologischen Analysen wurden in diesem Projekt im Institut für medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Parasitologie durchgeführt. In beiden Versuchsteilen wurden unterschiedliche Tiere verwendet, da für die Extraktion der DNA das gesamte Gewebe eingesetzt wurde und damit weitere Untersuchungen der Tiere ausgeschlossen waren. Dieser Umstand muss bei der Analyse der Ergebnisse mit einbezogen werden.

In allen Versuchsreihen ließ sich anhand der α -Diversität die Tendenz beobachten, dass zu Beginn der Experimente eine diverse, mikrobielle Gemeinschaft vorlag, die mit der Zeit unterschiedlich stark abgenommen hat. Die α -Diversität, die mit dem Shannon-Index beschrieben wird, berücksichtigt neben der Anzahl an Taxa, auch die gleichmäßige Verteilung der unterschiedlichen Taxa in einer Probe. Am ersten Versuchstag lag der Shannon-Index meist oberhalb von 3,0. Zu diesem Zeitpunkt wurden die Flusskrebse allerdings auch noch nicht mit den unterschiedlichen Parametern inkubiert. In den Versuchsreihen, die bei 24 °C durchgeführt wurden, fiel die α -Diversität rapide von Tag 1 zu Tag 2. Insbesondere unter anaeroben Bedingungen nahm die bakterielle Vielfalt schnell ab, sodass vermutlich wenige, an die sauerstoffarmen Bedingungen angepasste Organismen dominierten (siehe Abbildung 18 - Abbildung 21). Allerdings ließ sich ab Tag 4 erneut ein leichter Anstieg in der α -Diversität beobachten. Lediglich in Versuchsreihe 6, bei der die Proben unter anaeroben Bedingungen mit sterilem Wasser inkubiert wurden, war dieser Trend nicht vorhanden und die α -Diversität fluktuierte um einen Shannon-Index von 1,2.

3. Ergebnisse

Insgesamt können zehn dominierende Genera beschrieben werden, die zum Teil in allen (z.B. *Aeromonas*, *Clostridium*), zum Teil auch nur in einzelnen (z.B. *Iodobacter*) Versuchsreihen in größerer Menge vorkamen. Der zeitliche Verlauf der Häufigkeiten dieser Genera wurde anhand der Versuchstage und Triplikate näherungsweise simuliert und ist in den Übersichtsgraphiken (siehe Abbildung 18 - Abbildung 21) dargestellt. Ein ähnlicher Verlauf der häufigsten Genera ließ sich zwischen Versuchsreihe 1 (aerob, 24 °C, unsteriles Seewasser) und Versuchsreihe 5 (anaerob, 24 °C, unsteriles Seewasser) beobachten (siehe Abbildung 18). Während zu Beginn der Versuchsreihe 5 zu allen Ansätzen β -Mercaptoethanol gegen die Autolyse hinzugegeben und diese in den speziellen GasPak™ Beuteln zur Erzeugung eines anaeroben Milieus verpackt wurden, wurden die Versuchsbehälter in der ersten Reihe ohne zusätzliche Vorbehandlung und mit leicht offenem Deckel gelagert. Ein Schütteln der Versuchsbehältnisse zur besseren Sauerstoffversorgung konnte nicht durchgeführt werden, da die Bewegung den Zerfall der Flusskrebse beschleunigt hätte. Beide Experimente wurden vor allem von Spezies der Genera *Aeromonas*, *Clostridium* und *Acetobacteroides* besiedelt. Zusätzlich dazu konnten *Proteocatella* sp. nachgewiesen werden, die ihren Höhepunkt zwischen Tag 4 und Tag 7 mit bis zu 10 % erreichten und anschließend in geringerer Menge fluktuierten. Zu Beginn beider Versuchsreihen ließ sich ein starker Anstieg von Mitgliedern der Gruppe *Aeromonas* verzeichnen, die in Reihe 5 bereits nach dem 4. Versuchstag, in Reihe 1 nach dem 4. leicht und spätestens nach dem 7. Versuchstag stark abgenommen haben. Simultan zur Abnahme der Aeromonaden, nahm die Menge an Clostridien zwischen Tag 4 und 10 zu, um sich anschließend wieder leicht zu verringern. Die Gattung *Acetobacteroides* dominierte den Versuchsaufbau in Versuchsreihe 1 ab dem 12. und in Versuchsreihe 5 ab dem 10. Tag. Die Zunahme dieser Spezies konnte in beiden Fällen mit dem Zerfall einiger wichtiger Organe und Körperteile, wie der Verdauungsdrüse (Hepatopankreas), dem Ganglion oder den Muskeln, assoziiert werden. Generell war der zeitliche Verlauf des Zerfalls des Weichgewebes in beiden Versuchsreihen vergleichbar. Zwischen Tag 3 und Tag 4 verfärbten sich die Muskeln pink und der Magen wurde stark abgebaut. Unter Sauerstoffausschluss (V5) löste sich der Hepatopankreas an Tag 4 etwas früher auf als unter aeroben Bedingungen (V1) an Tag 7. Spätestens an Tag 7 waren auch die weiteren Organsysteme, wie die Muskeln, die Kiemen, der Darm oder der Cephalothorax, makroskopisch nicht mehr differenziert erkennbar. Ein Farbumschlag der Kutikula von blau-grau zu rosa-orange, der durch die Abspaltung des Farbstoffes Astaxanthin von Proteinen hervorgerufen wird, konnte mit Sauerstoffzirkulation (V1) nach zwei Versuchstagen, unter anaeroben Startbedingungen (V5) komplett erst nach 14 Tagen beobachtet werden.

3. Ergebnisse

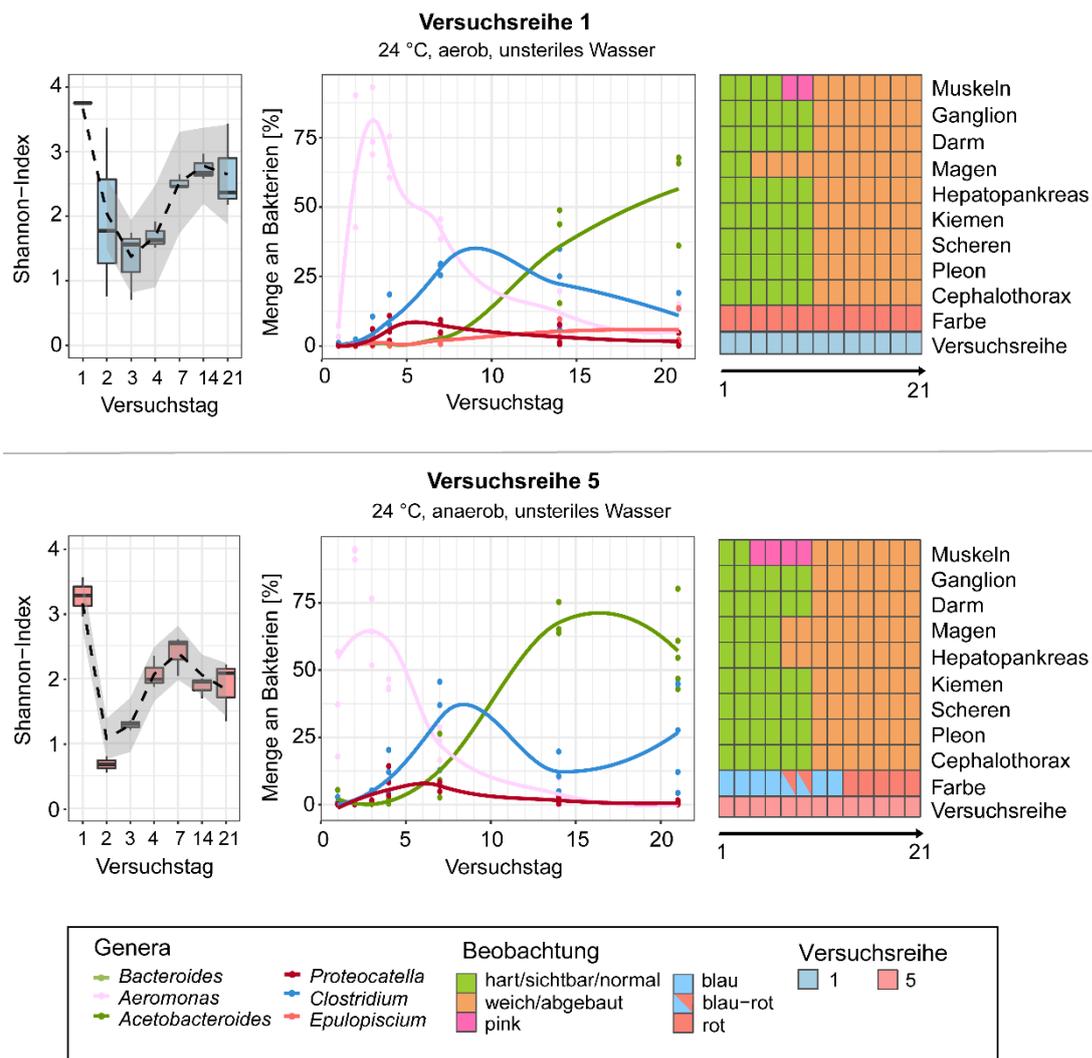


Abbildung 18: Ergebnisse der mikrobiologischen und morphologischen Analysen der Versuchsreihen 1 (aerob, 24 °C, unsteriles Seewasser) und 5 (anaerob, 24 °C, unsteriles Seewasser). Neben der α -Diversität (Shannon-Index, links), sind der zeitliche Verlauf der dominierenden Genera (Mitte) und der optische Zerfall der Körperbereiche und Organe der Flusskrebse (rechts) über eine Versuchsdauer von 21 Tagen dargestellt.

In Versuchsreihe 5 (anaerob, 24 °C, unsteriles Seewasser) färbte sich zuerst der Cephalothorax am 3. Tag rosa-orange, die Scheren und das Pleon blieben blau-grau gefärbt. Der Cephalothorax war ab diesem Moment ebenfalls deutlich weicher in der Struktur, wohingegen die restlichen Bereiche intakt und härter erschienen. Mithilfe eines Mikro-Computertomographen (μ -CT) wurden Vergleichstiere auf die Bildung von Kalzit-Präzipitationen untersucht, wobei in den Versuchsreihen 1 und 5 ab Tag 3 eine Aggregation von Kalzit-Kristallen in den Scheren nachgewiesen werden konnte. In beiden Fällen nahm die Größe und die Menge der Calciumcarbonat-Verbindungen über den Versuchsverlauf zu (siehe Abbildung 33), sodass nicht nur in den Scheren Aggregate

3. Ergebnisse

präzipitiert wurden, sondern ebenfalls in verschiedenen Bereichen im Cephalothorax. Besonders hierbei war, dass das Kalzit lediglich auf der inneren Seite der Kutikula ausgefallen ist (vgl. Mähler, 2021).

Die Versuchsreihen 2 (aerob, 24 °C, steriles Seewasser) und 6 (anaerob, 24 °C, steriles Seewasser) wurden ebenfalls bei 24 °C durchgeführt, allerdings wurde hier zum Ansetzen steriles Seewasser verwendet. Das Wasser wurde am Vortag für mindestens 20 min bei 121 °C autoklaviert, um sowohl die lebenden Zellen, als auch mögliche Bakteriensporen abzutöten. Im Vergleich zu Versuchsreihe 2, bei der die Probenbehälter mit leicht offenem Deckel gelagert wurden, wurden im 6. Experiment wieder anaerobe Startbedingungen hergestellt. Die Diversität, der Verlauf der häufigsten Genera und die optischen Beobachtungen des Zerfalls sind in Abbildung 19 aufgezeigt. Der Verlauf der häufigsten Bakterien war in beiden Versuchsteile stark unterschiedlich. Während in Versuchsreihe 2 (aerob, 24 °C, steriles Seewasser) Spezies des Genus *Aeromonas* sowohl zu Beginn an Tag 3 und Tag 4, als auch wieder nach 14 Tagen dominierten, konnten sich größere Mengen *Clostridium* sp. im mittleren Versuchsteil, zwischen Tag 4 und Tag 7, ansiedeln. Lediglich ab Tag 14 ließ sich ein leichter Anstieg an *Ruminiclostridium* sp. und *Sporobacter* sp. beobachten. Besonders am Zerfall des Weichgewebes war, dass die Kiemen erst an Tag 14 zersetzt wurden, die weiteren Organsysteme (Cephalothorax, Pleon, Scheren, Darm, Ganglion, Muskeln) aber bereits an Tag 7 nicht mehr differenziert erkennbar waren. Der Magen wurde sogar noch früher an Tag 3 abgebaut. Im Anschluss daran färbten sich die Muskeln an Tag 4 pink. Im Vergleich dazu ließ sich der Farbumschlag der Muskeln von weiß zu pink unter anaeroben Bedingungen, in Versuchsreihe 6 (anaerob, 24 °C, steriles Seewasser), schon nach drei Versuchstagen beobachten. Der Verlauf des Zerfalls mit Sauerstoffabschluss war vergleichbar zu Versuchsreihe 5 (anaerob, 24 °C, unsteriles Seewasser). Auf die Verfärbung der Muskeln, folgte der Abbau des Magens und der Verdauungsdrüse. In beiden Versuchsreihen (V2, V6) kam es daraufhin zu einem Anstieg der Gattung *Acetobacteroides* sp.

3. Ergebnisse

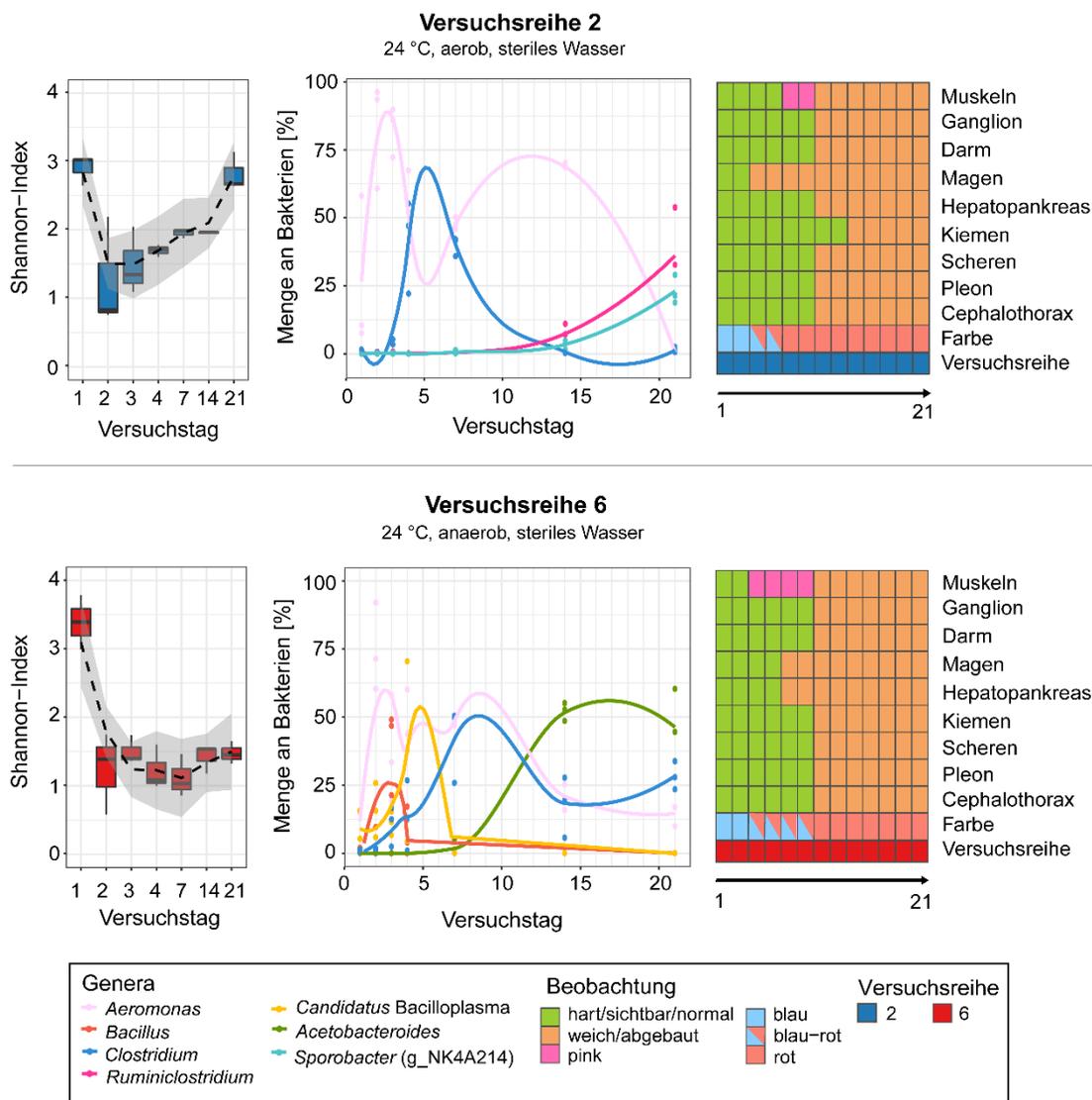


Abbildung 19: Ergebnisse der mikrobiologischen und morphologischen Analysen der Versuchsreihen 2 (aerob, 24 °C, steriles Seewasser) und 6 (anaerob, 24 °C, steriles Seewasser). Neben der α -Diversität (Shannon-Index, links), sind der zeitliche Verlauf der dominierenden Genera (Mitte) und der optische Zerfall der Körperbereiche und Organe der Flusskrebse (rechts) über eine Versuchsdauer von 21 Tagen dargestellt.

Nach sieben Tagen bei 24 °C unter anaeroben Bedingungen und in sterilem Wasser (V6) war das Gewebe der sonstigen Organsysteme nicht mehr intakt. Die Färbung des Flusskrebse wechselte in Versuchsreihe 2 (aerob, 24 °C, steriles Seewasser) nach vier Versuchstagen von blau-grau zu rosa-orange. Unter anaeroben Bedingungen in Versuchsreihe 6 (anaerob, 24 °C, steriles Seewasser) ließ sich zwar schon nach drei Tagen eine leichte rosa Färbung des Cephalothorax beobachten, der gesamte Krebs zeigte jedoch erst nach sieben Tagen eine komplette Umfärbung. In dieser Versuchsreihe (V6) lag zu Beginn des Experiments an Tag 3 *Bacillus* sp. (~ 40 %) und an Tag 4 *Candidatus Bacilloplasma* sp. (~ 40 %) in größerer Menge vor. Beide Genera wurden anschließend

3. Ergebnisse

komplett verdrängt. Neben *Acetobacteroides* sp. wurde der Versuchsaufbau ebenfalls von Spezies der Genera *Aeromonas* und *Clostridium* dominiert. Die Clostridien nahmen, wie in Versuchsreihe 5 (anaerob, 24 °C, unsteriles Seewasser) nach Versuchstag 3 zu und zeigten ihren Höhepunkt mit ca. 40 % nach Tag 7. Anschließend verringerte sich die Menge leicht. Die Mitglieder des Genus *Aeromonas* besiedelten das Gewebe ungefähr bis zum 10. Tag in größerer Anzahl und schwankten hierbei um 50 %. Im späteren Verlauf ließ sich eine Abnahme auf ca. 20 % beobachten. Wie auch in den Versuchsreihen 1 (aerob, 24 °C, unsteriles Seewasser) und 5 (anaerob, 24 °C, unsteriles Seewasser) konnte in den Reihen 2 und 6, die mit sterilem Wasser angesetzt wurden, eine Präzipitation von Kalzit-Kristallen nach Versuchstag 2 nachgewiesen werden, allerdings in deutlich geringerem Ausmaß (vgl. Mähler, 2021).

Unter kalten Bedingungen bei 4 °C in unbehandeltem Wasser nahm die α -Diversität nach Versuchstag 1 ab, jedoch in deutlich geringerem Ausmaß als in den anderen Versuchsreihen. Mit Sauerstoffabschluss wurde die Besiedelung bis zum vierten Probenstag (Tag 21) weniger (Shannon-Index von 3,0 auf 1,4) und nahm dann wieder leicht zu (Shannon-Index 2,3). In Versuchsreihe 3 (aerob, 4 °C, unsteriles Seewasser), die mit aeroben Startbedingungen angesetzt wurde, verringerte sich der Shannon-Index von 3,6 auf 2,4 und verblieb über den restlichen Versuchsablauf bei ähnlichen Werten. Der Zerfall des Weichgewebes war generell unter kälteren Bedingungen stark verzögert. In drei (V3, V4, V8) von vier Versuchsreihen, die bei 4 °C inkubiert wurden, waren die Muskeln, der Darm und das Ganglion am Versuchsende noch intakt. Lediglich in Versuchsreihe 7 (anaerob, 4 °C, unsteriles Seewasser) waren alle beobachteten Organsysteme nach 105 Tagen zerlegt. Die Versuche wurden unter kalten Bedingungen verlängert und die Zeitspanne zwischen den Probenstagen erhöht. Wie in Abbildung 20 aufgezeigt, ließ sich mit Sauerstoffeintrag und mit unsterilem Wasser (V3) ein Zerfall des Cephalothorax, des Pleons, der Scheren, des Ganglions und der Verdauungsdrüse erst nach 75 Tagen beobachten. Zeitgleich verfärbten sich die Muskeln nach pink. Die Kiemen wurden erst im Zeitraum zwischen 75 und 105 Tagen abgebaut. In dieser Versuchsreihe schwankte die Zusammensetzung der Bakteriengemeinschaft des Weichgewebes stark. Zu Beginn dominierte *Aeromonas* sp., wobei innerhalb der ersten sieben Tage neben *Clostridium* sp. auch Spezies des Genus *Proteocatella* zunahmen.

3. Ergebnisse

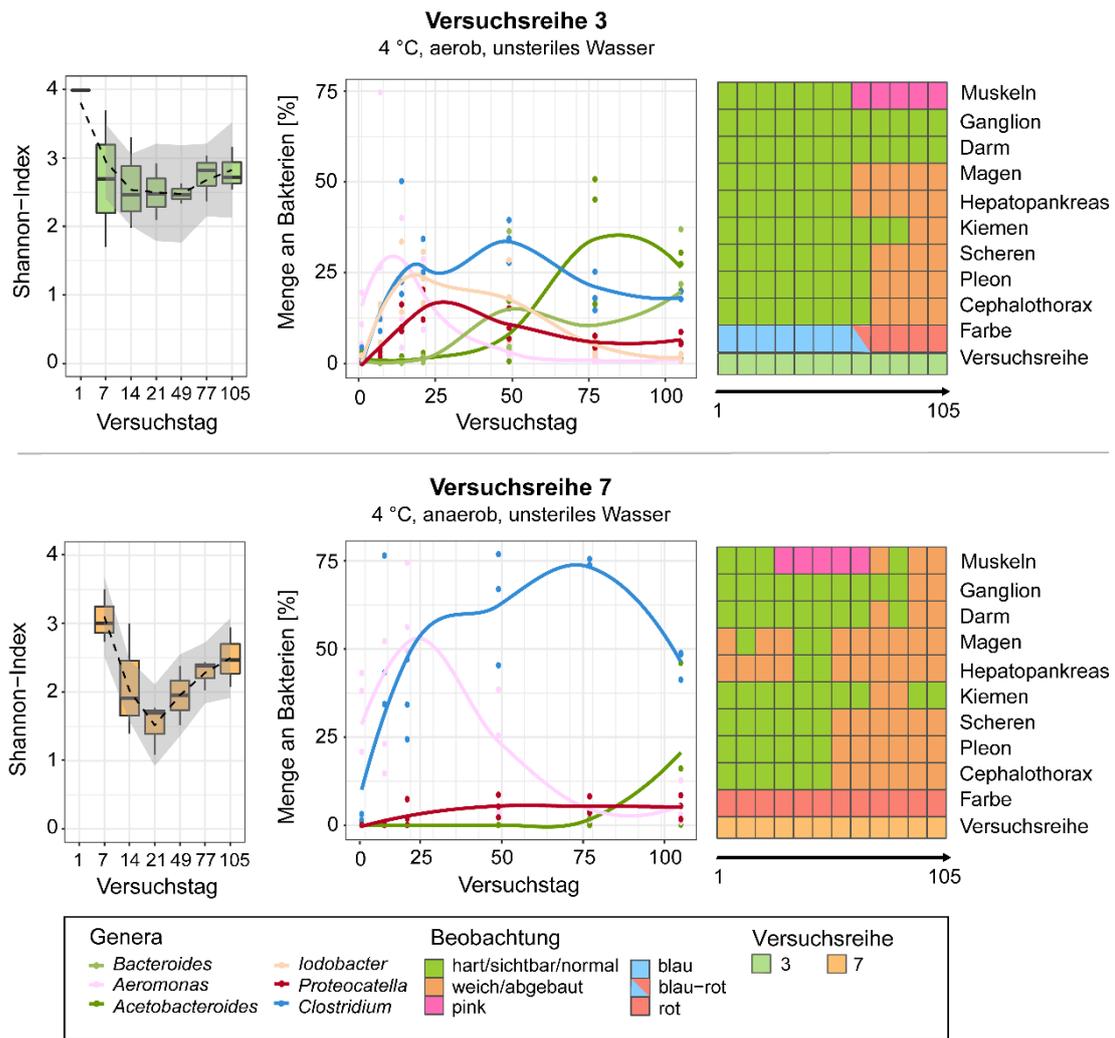


Abbildung 20: Ergebnisse der mikrobiologischen und morphologischen Analysen der Versuchsreihen 3 (aerob, 4 °C, unsteriles Seewasser) und 7 (anaerob, 4 °C, unsteriles Seewasser). Neben der α -Diversität (Shannon-Index, links), sind der zeitliche Verlauf der dominierenden Genera (Mitte) und der optische Zerfall der Körperbereiche und Organe der Flusskrebse (rechts) über eine Versuchsdauer von 105 Tagen dargestellt.

Die Dominanz der Aeromonaden oder Clostridien war auch in ihrem Ausmaß nicht vergleichbar zu den bisher beschriebenen Versuchsreihen, sondern schwankte um Werte von ungefähr 20 %. Die Menge der *Aeromonas* sp. nahm nach ungefähr 14 Versuchstagen stark ab und fiel ab Tag 49 auf 0 %. Neben *Bacteroides* sp. nach Probenstag 21, nahm auch die Anzahl der Spezies des Genus *Acetobacteroides* ab Tag 49 zu. Die Letzteren dominierten den Versuchsaufbau innerhalb des letzten Viertels. Im Vergleich dazu, konnten sich *Acetobacteroides* sp. in Versuchsreihe 7 (anaerob, 4 °C, unsteriles Seewasser) kaum durchsetzen, hier nahm die Menge erst nach 75 Tagen leicht zu. In diesem Experiment dominierten anfänglich die Aeromonaden bis zum Versuchstag 21 und machten ungefähr 55 % aus. Anschließend verringerten sie sich wieder deutlich. Die dominante Gattung

3. Ergebnisse

in diesem Versuchsteil war *Clostridium*. Spezies dieses Genus verzeichneten einen extremen Anstieg innerhalb der ersten Tage und machten im Verlauf des Experimentes zwischendurch bis zu 76 % der gesamten Bakteriengemeinschaft aus. Im Gegensatz zu den anderen Versuchsreihen, die bei 4 °C inkubiert wurden (V3, V4, V8), wurde das Gewebe in Versuchsreihe 7 (anaerob, 4 °C, unsteriles Seewasser) stark zersetzt. Nach sieben Tagen zeigten die Verdauungsdrüse und der Magen bereits Veränderungen in ihrer Struktur und waren nach 49 Tagen bereits stark zerfallen. Eine Verfärbung der Muskeln zu pink ließ sich nach 21 Tagen beobachten und ein starker Abbau der Muskeln, der Kiemen und des Darms war nach 76 Tagen sichtbar. Die restlichen Organsysteme waren nach 49 Tagen nicht mehr intakt, lediglich das Ganglion überdauerte bis zum Versuchstag 76 und scheint anschließend aktiv abgebaut worden zu sein, sodass zum Versuchsende alle beobachteten Organsysteme und Körperbereiche zerfallen waren.

Die Versuchsreihen 4 (aerob, 4 °C, steriles Seewasser) und 8 (anaerob, 4 °C, steriles Seewasser) ähnelten sich in der bakteriellen Zusammensetzung stark (siehe Abbildung 21). Während die Proben an Tag 1 von unterschiedlichsten Bakterien besiedelt waren und in beiden Versuchsreihen eine α -Diversität von einem Shannon Index von über 3,0 vorlag, setzten sich in beiden Fällen anschließend Mitglieder des Genus *Aeromonas* durch. In der Versuchsreihe 8, in der zu Beginn des Experimentes ein anaerobes Milieu erzeugt wurde, zeigte sich diese Entwicklung bereits am zweiten Probenstag, was sich in einer stark verringerten α -Diversität (Shannon Index: $\sim 1,5$) widerspiegelte. Nach sieben Tagen waren hier zwei von drei Replikaten bis zu 76 % von *Aeromonas* sp. dominiert. Im weiteren Verlauf war die mikrobielle Gemeinschaft zu mindestens 93 % aus dieser Gattung zusammengesetzt und der Shannon-Index sank auf $\sim 0,5$. Dieser Verlauf ließ sich in der Versuchsreihe 4 (aerob, 4 °C, steriles Seewasser) erst nach 14 Tagen, beziehungsweise am dritten Probenstag, beobachten. Bei dieser Versuchsreihe nahm die α -Diversität vom dritten auf den vierten Probenstag von $\sim 2,2$ auf 0,8 ab.

Obwohl in Versuchsreihe 8 (anaerob, 4 °C, steriles Seewasser) der Magen und die Verdauungsdrüse schon nach 21 Tagen abgebaut waren, überdauern andere Organsysteme, wie die Kiemen, der Darm, das Ganglion, die Muskeln oder die Scheren das gesamte Experiment. Erst nach 105 Tagen waren der Cephalothorax und das Pleon zerfallen. Eine Umfärbung der Muskeln nach pink konnte nach 49 Tagen nachgewiesen werden. Das Gewebe in Versuchsreihe 4 (aerob, 4 °C, steriles Seewasser) blieb deutlich länger intakt, war jedoch nach 105 Tagen zum Teil stärker zerfallen als unter Sauerstoffausschluss in Versuchsreihe 8 (anaerob, 4 °C, steriles Seewasser).

3. Ergebnisse

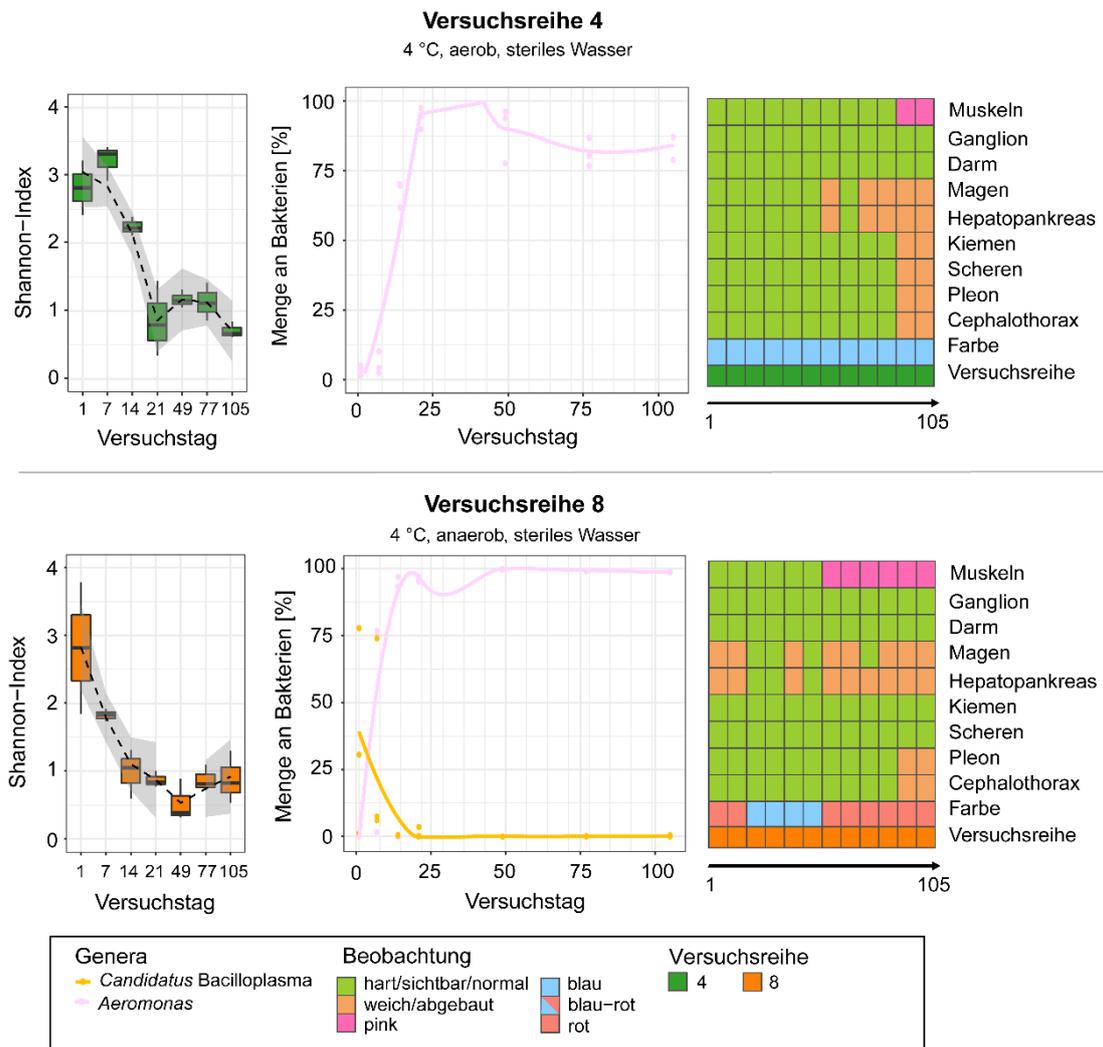


Abbildung 21: Ergebnisse der mikrobiologischen und morphologischen Analysen der Versuchsreihen 4 (aerob, 4 °C, steriles Seewasser) und 8 (anaerob, 4 °C, steriles Seewasser). Neben der α -Diversität (Shannon-Index, links), sind der zeitliche Verlauf der dominierenden Genera (Mitte) und der optische Zerfall der Körperbereiche und Organe der Flusskrebse (rechts) über eine Versuchsdauer von 105 Tagen dargestellt.

Der Magen und die Verdauungsdrüse zersetzten sich zwischen Versuchstag 49 und Versuchstag 77. Bis auf die Muskeln, den Darm und das Ganglion, wurden alle anderen Organsysteme bis zum Versuchstag 105 abgebaut. In allen Versuchsreihen, die unter kalten Bedingungen durchgeführt wurden, konnte keine Präzipitation von Kalzit nachgewiesen werden. Zwar wiesen einige Tiere Gastrolithen auf, die auch über die Zeit in ihrer Größe abnahmen, und die Anzahl der freien Calcium-Ionen nahm ebenfalls zu, allerdings konnte scheinbar kein Calciumcarbonat bei diesen Temperaturen präzipitieren.

3.3.4. Bioinformatische Vorhersagung metagenomischer Funktionen

Die Sequenzierung der 16S-rRNA-Amplikons ermöglicht eine Analyse der genauen Zusammensetzung einer mikrobiellen Gemeinschaft. Allerdings ist die Einschätzung der metabolischen Aktivität und die Eingruppierung der Organismen aufgrund ihrer Eigenschaften, wie der Sauerstofftoleranz, schwierig. Vor allem bei vielen Umwelt-assoziierten Mikroorganismen ist die Studienlage gering und damit die vorhandenen Informationen begrenzt. Für eine detaillierte Analyse der metabolischen Aktivität der Bakterien müsste das gesamte Genom („Whole Genome Shotgun-Sequencing“) sequenziert oder Metatranskriptom-Analysen durchgeführt werden. Bei den Metatranskriptom-Studien wird beispielsweise die gesamte mRNA („messenger RNA“), also die aktive RNA, in einer Probe analysiert. Beide Methoden sind sehr aufwändig und teuer, weswegen verschiedene bioinformatische Tools versuchen mit speziellen Algorithmen anhand der 16S-rRNA-Amplikons Vorhersagen über die metabolische Aktivität und andere Eigenschaften der Organismen zu treffen. Diese Methoden sind limitiert und die Ergebnisse sollten immer kritisch betrachtet werden. In diesem Projekt wurden für die bioinformatische Vorhersage zwei verschiedene Analyse-Tools verwendet. BugBase (Ward *et al.*, 2017) und PICRUSt2 (Douglas *et al.*, 2020) vergleichen die ermittelten ASVs mit bekannten Datenbanken und den Ergebnissen von ausführlichen Gesamt-Genom-Sequenzierungen. Da bestimmte Organismen und ihre Habitate im Fokus der Forschung liegen, wie zum Beispiel der menschliche Gastrointestinal-Trakt oder die Zusammensetzung verschiedene Böden, existieren deutlich mehr Vergleichsdaten und -studien zu diesen Forschungsbereichen. In dem Fall, dass für ein ASV keine Gesamt-Genom-Sequenzierung vorliegt, werden die Aktivität und die Eigenschaften durch einen Vergleich mit nah verwandten Organismen vorhergesagt. Aber auch hier ist die Nähe zum nächsten Verwandten innerhalb der stark erforschten Bereiche deutlich geringer und damit die Präzision der Vorhersage größer.

In Abbildung 22 ist der Anteil der Gram-negativen und Gram-positiven Organismen in den einzelnen Versuchsreihen, angeordnet nach den abiotischen Parametern, dargestellt. Das Gram-Verhalten der Organismen ermöglicht Aussagen über den Aufbau der bakteriellen Zellwand. Generell wurde die mikrobielle Gemeinschaft der Versuchsreihen von Gram-negativen Organismen dominiert. Diese Vorhersage deckt sich mit den Beobachtungen der mikrobiellen Verteilung anhand der 16S-rRNA-Sequenzen.

3. Ergebnisse

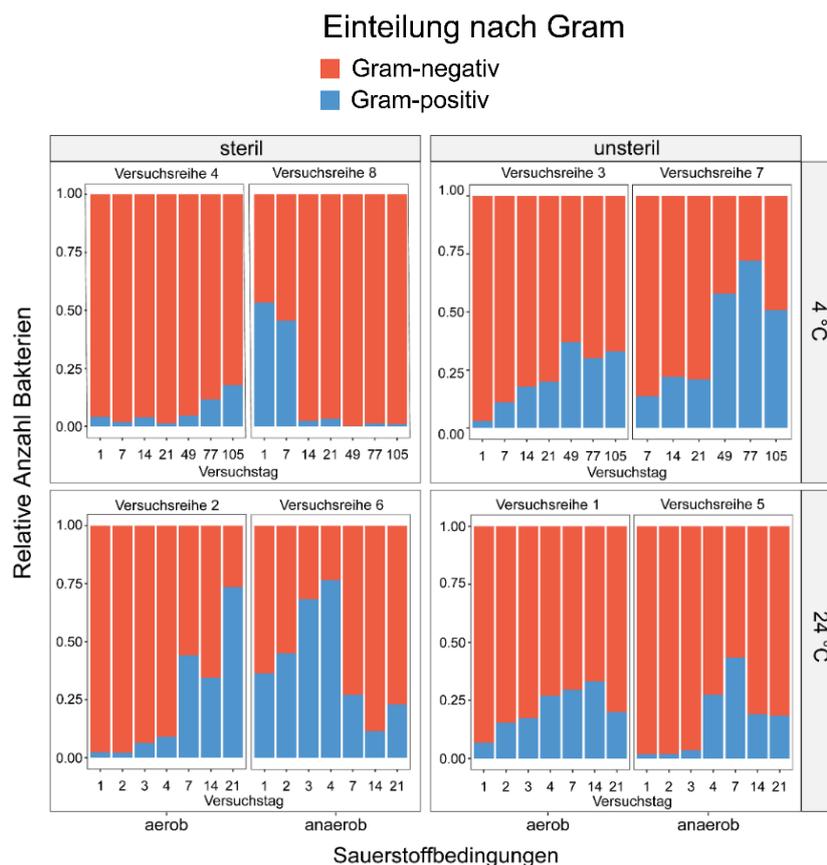


Abbildung 22: Graphische Darstellung der Gram-Verteilung innerhalb der Proben in den verschiedenen Versuchsreihen über den gesamten Versuchsverlauf. Je nachdem wie die bakterielle Zellwand aufgebaut ist, lassen sich die Bakterien mit dem Gram-Verfahren unterschiedlich anfärben und erscheinen entweder pink/rot oder lila/blau unter dem Mikroskop. Diese Anfärbe-Methode ermöglicht eine Unterscheidung zwischen den beiden Zellwand-Typen. Die Gram-Verteilung wurde anhand der ASVs mit dem Tool BugBase bioinformatisch vorhergesagt.

Insgesamt nahm die Anzahl der Gram-positiven Organismen über die Versuchsdauer unterschiedlich stark zu. Lediglich in Versuchsreihe 6 (anaerob, 24 °C, steriles Seewasser) und 8 (anaerob, 4 °C, steriles Seewasser) waren zu Beginn der Versuche mehr Gram-positive Organismen vorhanden, als am Ende. Während die Menge der Gram-positiven Bakterien in Versuchsreihe 8 von Tag 7 auf Tag 14 extrem abgenommen hat und anschließend um einen Wert von 3 % fluktuierte, nahm die Anzahl der Gram-positiven Mikroorganismen in Versuchsreihe 6 bis zum Tag 4 bis auf ~ 75 % zu, um dann rapide auf unter ~ 25 % zu sinken. In den Versuchsreihen 1 (aerob, 24 °C, unsteriles Seewasser), 3 (aerob, 4 °C, unsteriles Seewasser), 4 (aerob, 4 °C, steriles Seewasser) und 5 (anaerob, 24 °C, unsteriles Seewasser) machte die Anzahl der Gram-negativen Organismen immer über 50 % der gesamten Zusammensetzung aus. Der Anstieg der Gram-positiven Bakterien war in diesen Versuchsreihen gering, was vermuten lässt, dass die Gram-negativen Organismen den Versuchsaufbau und damit auch den Abbau bzw. die Präservierung dominierten. Am Ende der

3. Ergebnisse

Versuchsreihen 2 (aerob, 24 °C, steriles Seewasser) und 7 (anaerob, 4 °C, unsteriles Seewasser) lagen in den Proben über 50 % Gram-positive Organismen vor. Hier konnte ein sprunghafter Anstieg in der Menge der Gram-positiven Organismen nach 7 (V2) bzw. nach 49 Tagen (V7) beobachtet werden.

Das Tool BugBase kann neben der Zuordnung der Bakterien in Gram-positiv oder Gram-negativ, ebenfalls die Sauerstofftoleranz der Organismen ermitteln. Die ASVs werden mit bekannten Gesamt-Genomen verglichen und so der Anteil der strikt aeroben, strikt anaeroben und fakultativ anaeroben Bakterien bestimmt. Abbildung 23 zeigt die Verteilung der drei Gruppen in Abhängigkeit der Versuchsdauer. In allen Versuchsreihen nahm der Anteil der strikt aeroben Organismen rapide ab. Während zu Beginn der Experimente ~ 50 % der Bakterien dieser Gruppe zugeordnet werden konnten, sank die Menge meist innerhalb der ersten Versuchstage unter 10 %. Lediglich in den Versuchsreihen 3 (aerob, 4 °C, unsteriles Seewasser) und 4 (aerob, 4 °C, steriles Seewasser) war der Abfall der strikt aeroben Bakterien etwas langsamer und erst nach 77 (V3) bzw. nach 21 Tagen (V4) lag die Anzahl dieser Bakterien unterhalb von 20 %. Diese Beobachtung deckte sich mit der Abnahme des freien Sauerstoffs, der in Folge einer zunehmenden mikrobiellen Aktivität abgenommen hat. In den Versuchsreihen, die mit unbehandeltem Wasser angesetzt wurden (V1, V3, V5, V7), konnte simultan mit der Abnahme der strikt aeroben Bakterien, eine Zunahme der strikt anaeroben Mikroorganismen beobachtet werden, die am Ende der Experimente nahezu 100 % der bakteriellen Zusammensetzung ausgemacht haben. Die fakultativ anaeroben Bakterien, die die Abwesenheit von Sauerstoff über gewisse Zeitspannen tolerieren können, nahmen vor allem im mittleren Versuchsteil unterschiedlich stark zu.

3. Ergebnisse

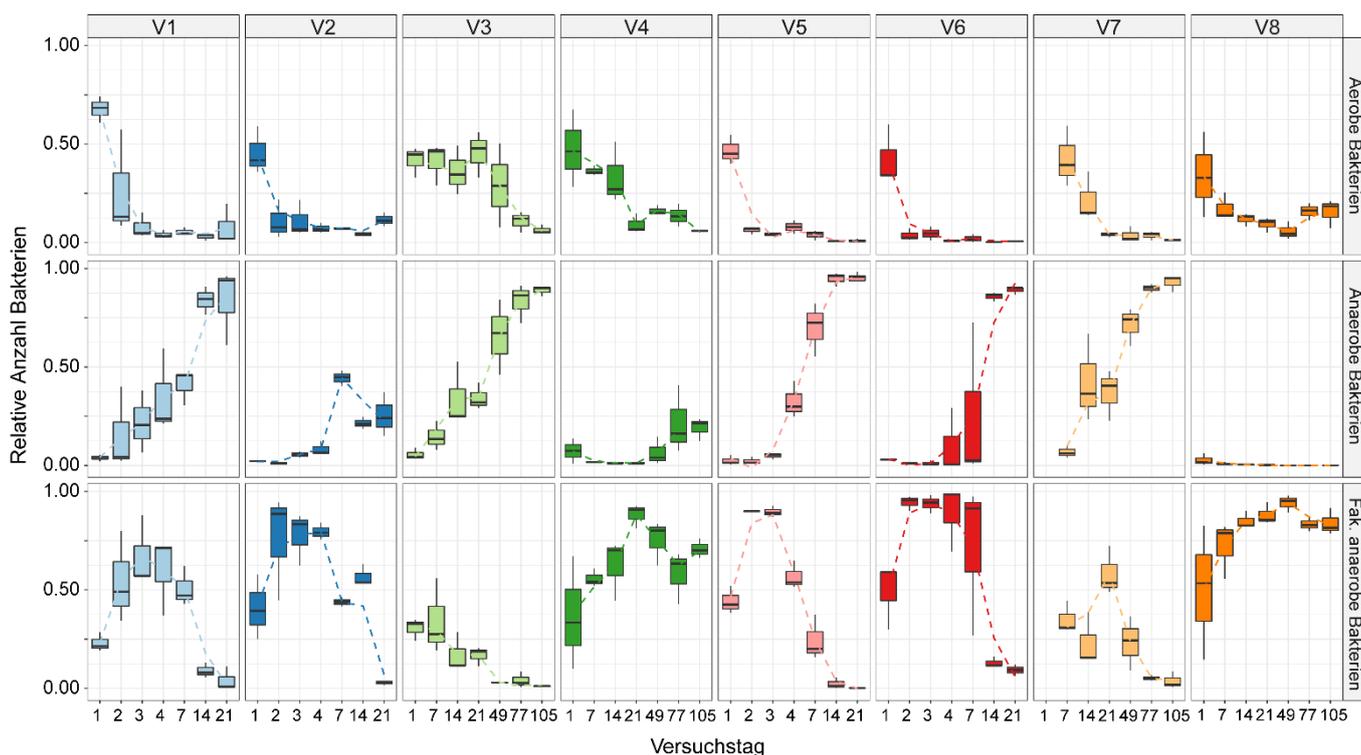


Abbildung 23: Verteilung der Bakterien in den Versuchsreihen aufgeteilt nach ihrer Sauerstofftoleranz über die gesamte Versuchsdauer. Die Verteilung wurde anhand der ASVs mit dem Tool BugBase bioinformatisch vorhergesagt und ist näherungsweise, weshalb die Summe der relativen Anzahl nicht 1,0 ergibt. V1 = Versuchsreihe 1 (aerob, 24 °C, unsteriles Seewasser), V2 = Versuchsreihe 2 (aerob, 24 °C, steriles Seewasser), V3 = Versuchsreihe 3 (aerob, 4 °C, unsteriles Seewasser), V4 = Versuchsreihe 4 (aerob, 4 °C, steriles Seewasser), V5 = Versuchsreihe 5 (anaerob, 24 °C, unsteriles Seewasser), V6 = Versuchsreihe 6 (anaerob, 24 °C, steriles Seewasser), V7 = Versuchsreihe 7 (anaerob, 4 °C, unsteriles Seewasser), V8 = Versuchsreihe 8 (anaerob, 4 °C, steriles Seewasser).

Bei den Experimenten, bei denen das Wasser vor Versuchsbeginn autoklaviert wurde (V2, V4, V6, V8), konnten sich strikt anaerobe Mikroorganismen scheinbar kaum durchsetzen. Lediglich in Versuchsreihe 6 (anaerob, 24 °C, steriles Seewasser) nahm die Anzahl der strikt Anaeroben nach Versuchstag 7 extrem zu, sodass diese Gruppe die Proben an Versuchstag 21 komplett dominierte. In den restlichen Versuchsreihen fluktuierten die strikt anaeroben Bakterien unterhalb von ~ 25 % mit einer Ausnahme in Versuchsreihe 2 (aerob, 24 °C, steriles Seewasser) an Tag 7, an dem ca. 45 % strikt anaerobe Organismen vorlagen. Unter anaeroben Startbedingungen und 4 °C (V8) war die Anzahl der strikt anaeroben Bakterien durchgehend unterhalb von 1 %. Bei kälteren Temperaturen scheint die Menge der fakultativ anaeroben Organismen die größte Gruppe in den Versuchen darzustellen, sie machten in den Versuchsreihen 4 (aerob, 4 °C, steriles Seewasser) und 8 (anaerob, 4 °C, steriles Seewasser) über 70 % der gesamten Bakterienpopulation aus. Im Vergleich dazu nahm die Anzahl der Organismen, die eine Sauerstoffabwesenheit über unterschiedlich lange Dauer tolerieren können, bei 24 °C (V2, V6) bis zum Versuchstag 4 stark zu und fiel anschließend auf unter

3. Ergebnisse

10 % bis zum Versuchsende. Zwischen den Versuchsreihen, die mit aeroben oder anaeroben Startbedingungen begonnen wurden, ließ sich kaum ein Unterschied in der Sauerstofftoleranz der bakteriellen Zusammensetzung beobachten. Auffällig ist lediglich, dass die Anzahl der strikt aeroben Organismen in Versuchsreihe 8 (anaerob, 4 °C, steriles Seewasser) deutlich geringer ist, als in den anderen Versuchsreihen.

Eine wichtige Eigenschaft der Bakterien ist die Fähigkeit einen Biofilm auszubilden. Viele Organismen sind in der Lage, alleine oder gemeinsam mit anderen Bakterien eine sessile Lebensweise auszuprägen. Dabei adhären sie an Oberflächen und schützen die mikrobielle Gemeinschaft vor äußeren Einflüssen durch die Ausbildung einer extrazellulären, polymeren Substanz (EPS). Die bioinformatische Vorhersage mit dem Tool BugBase ermöglicht eine Analyse der Organismen, die potentiell einen Biofilm ausbilden können (siehe Abbildung 24).

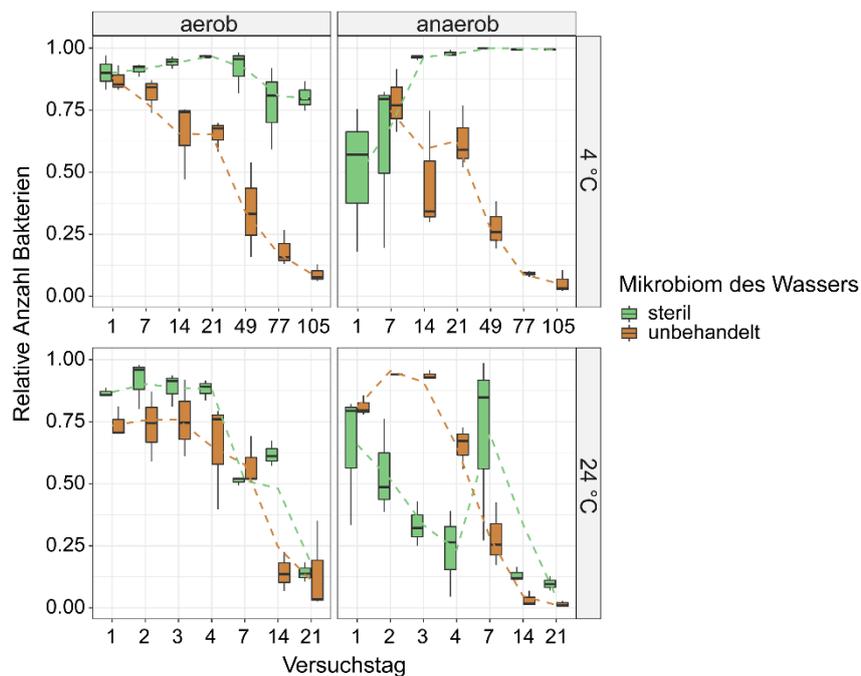


Abbildung 24: Anzahl der Bakterien, die in der Lage sind einen Biofilm zu bilden im Verlauf der Versuchsdauer. Die Daten sind nach den Parametern der Versuchsreihen aufgeteilt. Die Verteilung wurde anhand der ASVs mit dem Tool BugBase bioinformatisch vorhergesagt.

Auffällig hierbei ist, dass bei 4 °C und der Verwendung von sterilem Wasser (V4, V8) die Anzahl der biofilmbildenden Bakterien sehr hoch war. Während die Anzahl dieser Organismen bei Versuchsreihe 4 (aerob, 4 °C, steriles Seewasser) konstant oberhalb von 75 % lag und nur leichte Schwankungen aufgewiesen hat, zeigt Abbildung 24, dass bei anaeroben Startbedingungen in Versuchsreihe 8 (anaerob, 4 °C, steriles Seewasser) die Menge der Bakterien von Tag 7 zu Tag 14

3. Ergebnisse

stark angestiegen ist und anschließend bei nahezu 100 % fluktuiert hat. In allen anderen Versuchsreihen lagen laut der Vorhersage zu Beginn der Experimente größere Mengen an potentiellen Biofilmbildnern vor, die aber mit der Versuchsdauer deutlich abgenommen haben. In Versuchsreihe 1 (aerob, 24 °C, unsteriles Seewasser) und Versuchsreihe 2 (aerob, 24 °C, steriles Seewasser) blieb die Menge der Organismen, die einen Biofilm ausbilden können, innerhalb der ersten vier Versuchstage konstant hoch, erst danach sank ihre Anzahl. Ein ähnlicher Verlauf konnte bei den Versuchsreihen 5 (anaerob, 24 °C, unsteriles Seewasser) und Versuchsreihe 6 (anaerob, 24 °C, steriles Seewasser) beobachtet werden. Während in Versuchsreihe 5 bis zum dritten Probenstag sogar ein Anstieg der Biofilmbildner erfolgte, zeigte Versuchsreihe 6 eine konstante Abnahme bis zum siebten Versuchstag an dem die Anzahl der interessanten Bakterien stark angestiegen ist. Allerdings macht die extreme Standardabweichung des Boxplots deutlich, dass ein großer Unterschied zwischen den einzelnen Proben vorliegt und der plötzliche Anstieg an dieser Stelle mit Vorsicht interpretiert werden muss. Die Experimente, die bei 4 °C inkubiert und mit unbehandeltem Wasser angesetzt wurden (V3, V7), zeigten sowohl mit aeroben (V3), als auch anaeroben Startbedingungen (V7) ab dem ersten Versuchstag einen starken Abfall der biofilmbildenden Bakterien.

Neben dem Tool BugBase wurde ebenfalls mit PICRUS2 gearbeitet. Die Vorhersagen von PICRUS2 beziehen sich auf das Vorhandensein bestimmter Enzyme anhand derer zusätzlich noch Stoffwechselwege vorhergesagt werden können. Für die Analysen wurden die Enzyme oder Stoffwechselwege ausgewählt, die verwendet wurden, um die kultivierten Organismen zu charakterisieren (siehe Abschnitt 2.8.2.). Die Enzymklasse der Proteasen bzw. Peptidasen (EC 3.4) umfasst 16 verschiedene Subkategorien, die alle Hydrolasen umfassen, die die Spaltung von Peptidbindungen katalysieren. Die einzelnen Werte dieser Subkategorien wurden aufsummiert und gemeinsam dargestellt. Neben den Proteasen ist in Abbildung 25 auch die vorhergesagte Anzahl an Chitinase-, Lipase- und Urease-Produzenten aufgezeigt. Während Proteasen, Chitinasen und Lipasen in diesem Projekt als förderlich für den Abbau von Weichgewebe eingestuft wurden, soll eine Urease-Aktivität eher in einer Mineralisierung resultieren und damit eine Präservierung des labilen Gewebes unterstützen. Die Menge der Bakterien, die in der Lage sind, eine Protease auszubilden unterschied sich zwischen den einzelnen Versuchsreihen kaum und stieg kontinuierlich von ca. 3 % auf bis zu 4,3 % an. Lediglich bei 4 °C und mit sterilem Wasser (V4, V8) stagnierte die Anzahl bei ungefähr 3 % und veränderte sich kaum. Unter wärmeren Bedingungen bei 24 °C dagegen schien der Anstieg unter sterilen Bedingungen in den ersten vier Tagen sogar stärker zu sein, als in unbehandeltem Wasser (V2, V6). Die Menge der potentiellen Chitinase-Bildner nahm, genau wie

3. Ergebnisse

die Lipase-Bildner unter allen abiotischen Parametern in der Mitte der Versuchsreihen erst zu und fiel anschließend wieder auf den Ausgangswert zurück. Und auch hier stellten einzig die kalten Versuchsreihen bei 4 °C mit sterilem Wasser (V4, V8) eine Ausnahme dar. Sowohl die Anzahl der möglichen Chitinase-, als auch der Lipase-Produzenten stieg bis zum letzten Versuchstag an oder verblieb auf einem hohen Niveau.

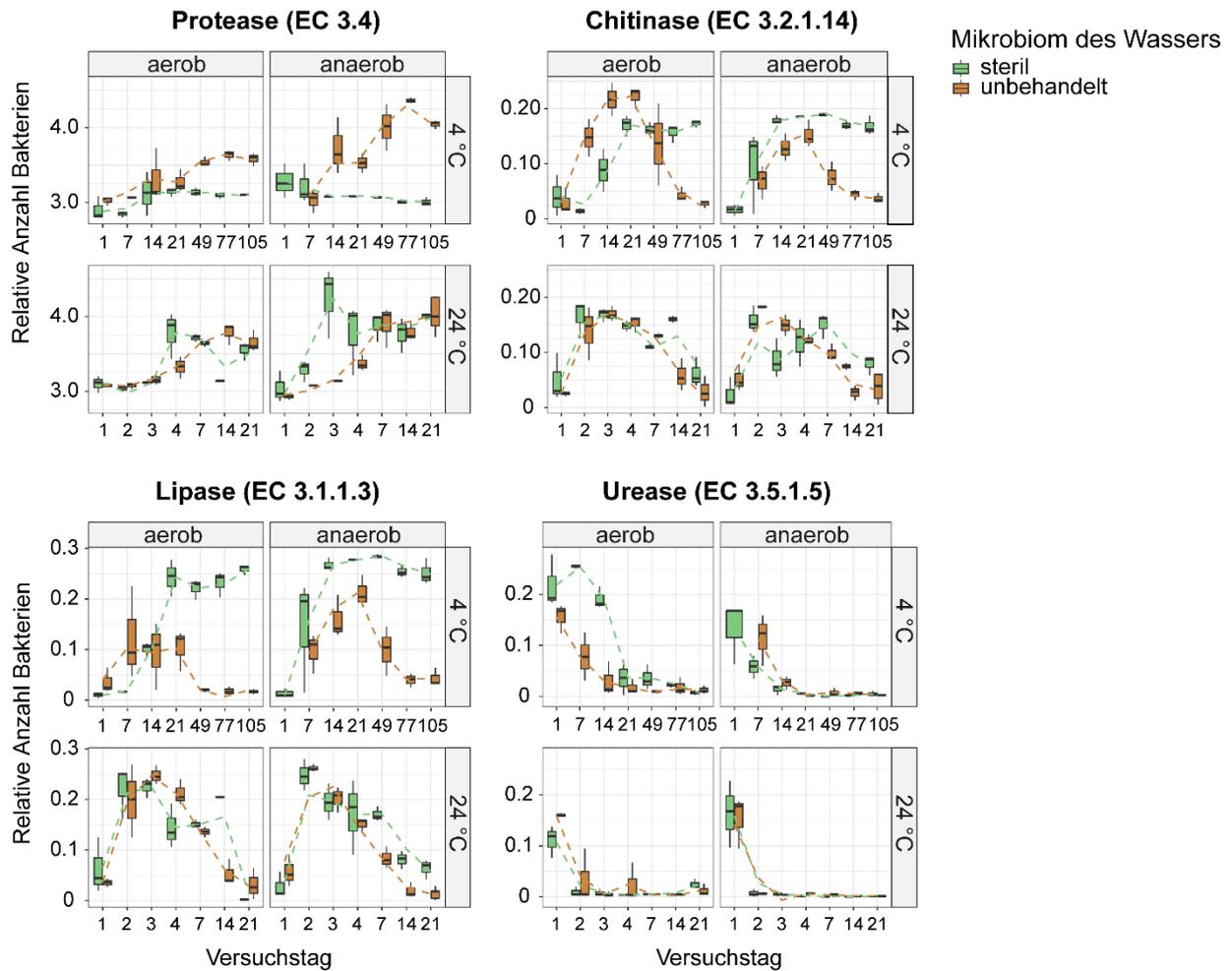


Abbildung 25: Verteilung der Bakterien, die bestimmte Enzyme synthetisieren können über die gesamte Versuchsdauer in den einzelnen Versuchsreihen. Es wurden die Enzyme analysiert, die unter Abschnitt 2.8.2. genauer beschrieben sind. Die Verteilung wurde anhand der ASVs mit dem Tool PICRUSt2 bioinformatisch vorhergesagt. Die EC-Nummern dienen der numerischen Klassifizierung der Enzyme, die eine direkte Einordnung der katalytischen Reaktion ermöglicht.

Der Sauerstoffgehalt zu Beginn der Versuchsreihen scheint kaum einen Einfluss auf den zeitlichen Verlauf der Bakterien zu haben, die die beobachteten Enzyme bilden können. Die Fähigkeit eine Urease auszubilden, um Harnstoff spalten zu können, nahm in allen acht Versuchsreihen innerhalb kürzester Zeit stark ab und lag anschließend nahezu bei 0 %. Bei Versuchsreihe 4 (aerob, 4 °C,

3. Ergebnisse

steriles Seewasser) ließ sich innerhalb der ersten sieben Versuchstage noch ein Anstieg der ureolytischen Bakterien verzeichnen, anschließend fiel die Menge aber bis zum Versuchstag 21 extrem ab. Wie schon bei den Ergebnissen der BugBase-Vorhersagen müssen die Beobachtungen auch bei der PICRUSt2-Analyse mit Vorsicht behandelt werden, da lediglich eine Vorhersage anhand der nachgewiesenen ASVs getroffen wird.

3.4. Isolation und Charakterisierung von Bakterien aus den Versuchsreihen

Der Einfluss einzelner Bakterienspezies auf den Zerfall oder die Präservierung von Weichgewebe ist ein nahezu unerforschtes Feld. Bakterien synthetisieren nicht nur eine große Anzahl an Exoenzymen, um Weichgewebe effektiv abzubauen zu können, sondern sind ebenso in der Lage, durch Mineralisierung den Erhalt des labilen Gewebes zu fördern. Innerhalb der Versuchsreihen sollten mithilfe verschiedener Strategien Bakterien isoliert und auf herkömmlichen Nährmedien angezogen werden. Die isolierten Bakterien wurden identifiziert und auf ihre Eigenschaften getestet. Dementsprechend wurden sie als förderlich oder nicht-förderlich für eine mögliche Fossilisation eingestuft. Mikroorganismen, die mehrfach nachgewiesen wurden, wurden grob typisiert, anschließend jedoch nicht weiter differenziert oder untersucht. Insgesamt konnten 154 verschiedene Bakterientypen isoliert und langfristig konserviert werden. Dabei wurden 41 Organismen aus einem speziellen Versuch für Biofilm-bildende Bakterien kultiviert und 113 Prokaryoten konnten mithilfe klassischer Anzuchtmethoden oder der „Extinction-to-Dilution“-Methode angezogen werden. Die Identifikation der Organismen wurde sowohl über ein MALDI-TOF/MS, als auch über den Vergleich der 16S-Sequenzen mit verschiedenen Datenbanken durchgeführt. Das verwendete MALDI-TOF/MS kann die aufgenommenen Spektren, die oftmals sehr charakteristisch für einzelne Genera oder auch Spezies sein können, mit einer Datenbank abgleichen und bekannten Spektren zuordnen.

3. Ergebnisse

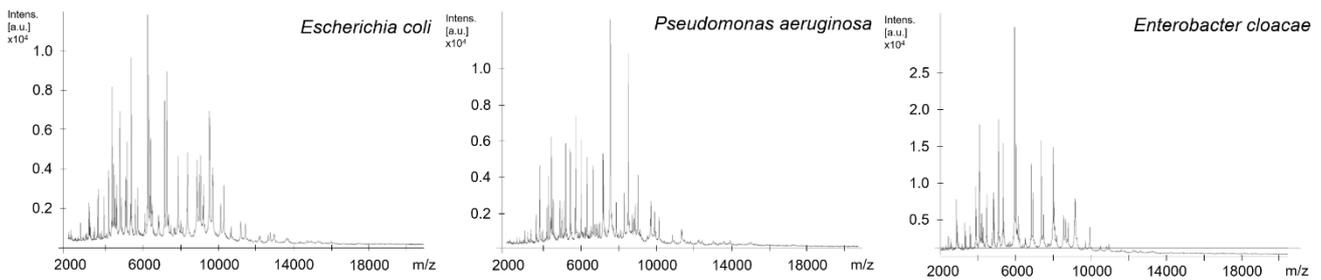


Abbildung 26: MALDI-TOF/MS Spektren zur Identifizierung unbekannter Isolate. Im Zuge der Versuchsreihen wurden Reinkulturen auf verschiedenen Nährmedien isoliert, die anschließend über mehrere Methoden identifiziert werden sollten. Zellmaterial, das in eine spezielle Matrix eingeschlossen ist, wird mit einem hochenergetischen Laserstrahl beschossen und die Flugbahn oder Flugzeit der angeregten Moleküle gemessen. Das aufgenommene Spektrum wird mit einer Datenbank abgeglichen und ist häufig Spezies-spezifisch.

Die verwendete Datenbank beinhaltet vor allem Human-assoziierte Bakterien, weshalb die Typisierung von Umwelt-assoziierten Mikroorganismen teilweise schwierig ist. In diesen Fällen wurde die 16S-rRNA-Sequenz der Organismen amplifiziert, nach Sanger sequenziert und die Sequenz anschließend mit der 16S-Sequenz-Datenbank EZBioCloud abgeglichen. Ein beispielhaftes Ergebnis einer 16S-rRNA-Sequenz-Analyse ist in Tabelle 23 dargestellt.

Tabelle 23: Beispielhaftes Ergebnis des Abgleiches der 16S-rRNA-Sequenz eines unbekannten Organismus mit der Datenbank EZBioCloud. Die Sequenz wurde zuvor über eine 16S-PCR amplifiziert und von den Sequenzierfirmen Microsynth oder GATC Biotech AG sequenziert. Im oberen Teil der Tabelle sind alle Informationen zu der Sequenz und der Datenbank aufgelistet, im unteren Teil sind die Vergleichsorganismen aufgezeigt.

Full Name	Unbekannt 1
Length	1.504 bp
Orientation	Forward
Completeness	100 %
Database ver.	2020.10.12

Rank	Name	Strain	Authors	Taxonomy	Accession	Pairwise Similarity (%)	Mismatch/ Total nt	Completeness (%)
1	<i>Iodobacter limnosediminis</i>	E1	Su <i>et al.</i> , 2013	Bacteria; Proteobacteria; Betaproteobacteria; Neisseriales; Neisseriaceae; Iodobacter	HM031078	98.92	15/1392	96.22
2	<i>Iodobacter fluviatilis</i>	ATCC 33051	Logan, 1989	Bacteria; Proteobacteria; Betaproteobacteria; Neisseriales; Neisseriaceae; Iodobacter	M22511	98.58	20/1409	99.31

3. Ergebnisse

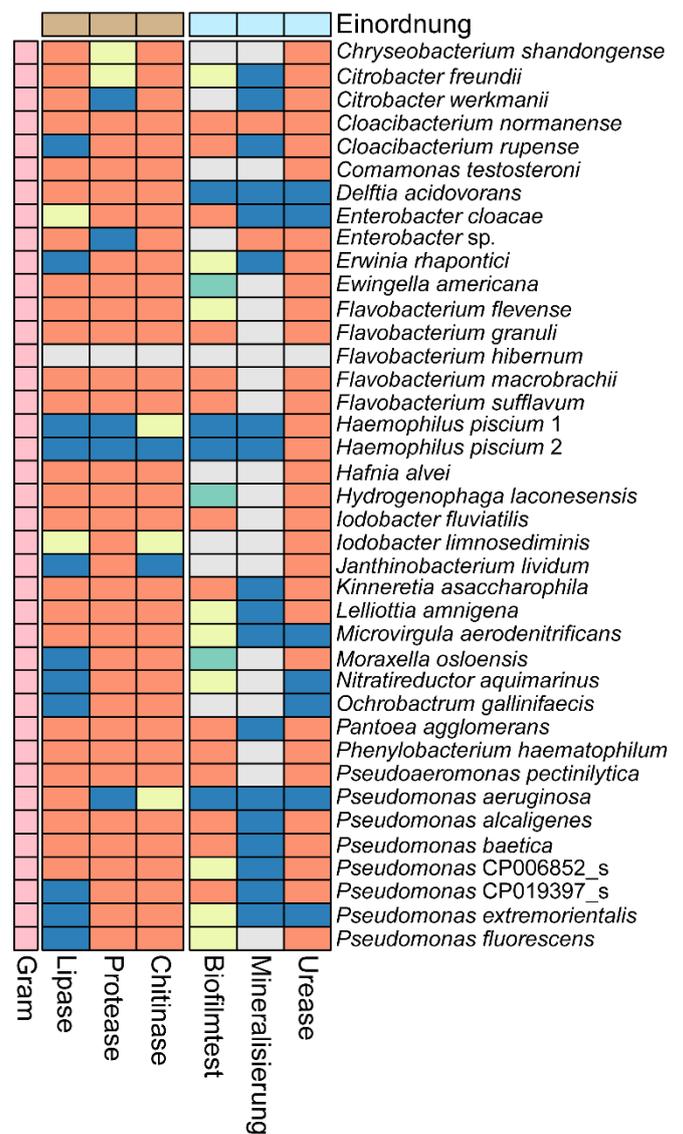
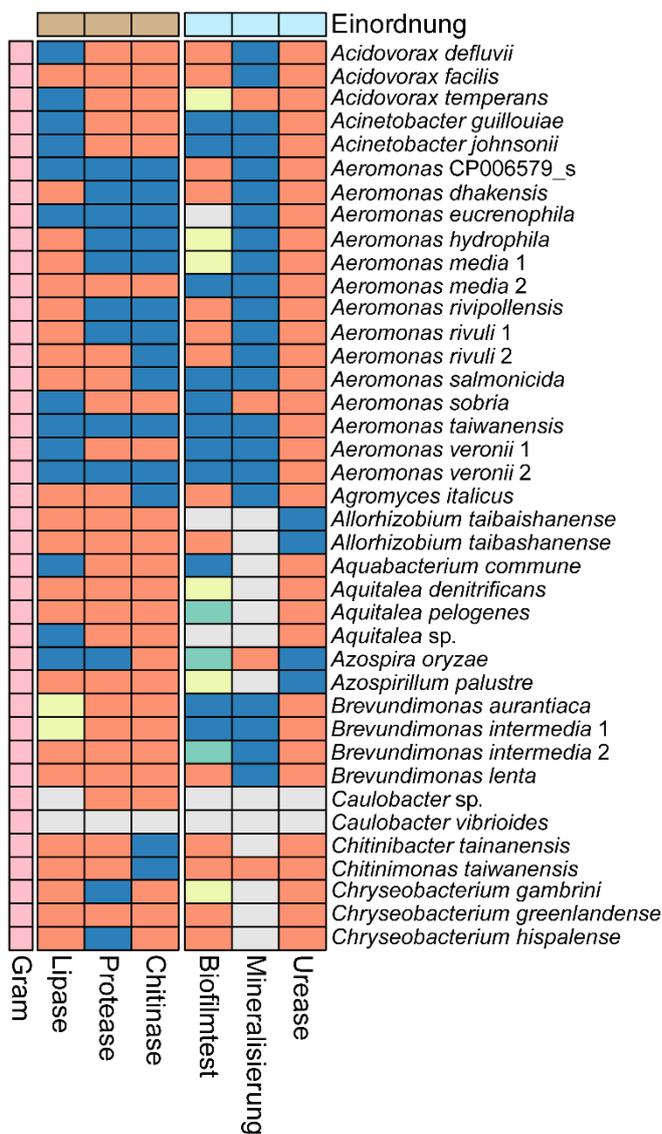
In der Übersichtstabelle werden alle relevanten Informationen dargestellt, neben der Länge der 16S-Sequenz, wird ebenfalls notiert, ob der analysierte Bereich den gesamten 16S-Abschnitt abdeckt („Completeness“). In diesem Beispiel wurde ein Bakterium identifiziert, welches durch eine Biofilmanreicherung im Zuge der 7. Versuchsreihe isoliert werden konnte. Das Bakterium konnte anhand seiner 16S-Sequenz erfolgreich der Spezies *Iodobacter limnosediminis* zugeordnet werden. Die Ähnlichkeit („Pairwise Similarity“) zwischen der eingespeisten DNA und der in der Datenbank vorliegenden Sequenz dieser Spezies lag bei 98,92 %. Sobald ein Wert von 98,75 % überschritten wird, kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei dem vorliegenden Bakterium um die zugeordnete Spezies handelt. Liegt die Ähnlichkeit unterhalb dieses Schwellenwertes kann es sich um ein bisher nicht beschriebenes Bakterium handeln. In diesem Fall müssten weitere Analysen durchgeführt werden, um das Bakterium eindeutig identifizieren zu können. Zusätzlich zur Ähnlichkeit wird dargestellt in wie vielen Nukleotiden sich die Sequenz von der Vergleichsprobe unterscheidet („Mismatch/Total nt“) und welche Autoren diese Spezies zum ersten Mal beschrieben haben („Author“).

Im Anschluss an die Typisierung der Bakterien wurden alle Organismen auf spezielle Eigenschaften hin untersucht. Da für die Fossilisation vor allem Charakteristika entscheidend sind, die entweder den Zerfall fördern oder eine Präservierung durch Mineralisierung begünstigen, wurden zu dieser Fragestellung passende Tests entwickelt. Auf speziellen colorimetrischen oder fluoreszierenden Nährmedien wurde die Synthese von degradierenden Exoenzymen, wie Lipasen, Proteasen oder Chitinasen überprüft. Die Mineralisierung wurde mithilfe eines speziellen Nährbodens getestet, der mit Calciumacetat angereichert wurde. Zusätzlich dazu wurde nachgewiesen, ob die Organismen eine Urease ausbilden können. Die proteolytische Spaltung von Harnstoff kann zu einem pH-Anstieg führen, wodurch die Bildung von Calciumcarbonat begünstigt wird. Außerdem sollten die Organismen auf ihre Fähigkeit einen Biofilm zu bilden, untersucht werden. Hierfür wurden die Bakterien in Triplikaten in Polystyrol-Platten angezogen und mögliche Exopolymerstrukturen mit Kristallviolett angefärbt. In Abbildung 27 sind alle isolierten Bakterien mit ihren speziellen Eigenschaften aufgezeigt. Die Fähigkeit Exoenzyme, wie Lipasen, Chitinasen oder Proteasen, zu synthetisieren wurde in den Bereich Abbau, eine mikrobiell-induzierte Mineralisierung, Produktion eines EPS oder Ausbildung einer Urease wurden dagegen als präservierend eingestuft. Im Fokus der Einschätzung stand die Suche nach einem Organismus, der keine Exoenzyme bildet und dafür die Präservierung des Gewebes durch Biofilmbildung oder Mineralisierung unterstützt. Bei den isolierten Organismen zeigte lediglich die Spezies *Delftia acidovorans* genau die gesuchten

3. Ergebnisse

Eigenschaften. *Yersinia intermedia* konnte nur einen schwachen Biofilm ausbilden, war jedoch in der Lage die Präzipitation von Mineralien zu induzieren und synthetisierte eine Urease. Außerdem wies dieser Organismen keine degradierenden Exoenzyme auf, sodass er ebenfalls förderlich für eine Präzipitation von Weichgewebe sein könnte. Zusätzlich zu den zuvor genannten Organismen könnte *Pseudomonas vancoverensis* ein vielversprechendes Bakterium sein, dass möglicherweise den Erhalt von Weichgewebe unterstützt, da es keine Exoenzyme synthetisiert, aber sowohl die Präzipitation von Calciumcarbonat induziert, als auch einen starken Biofilm gebildet hat.

Einordnung		Gram		Ausprägung	
	Abbau		?		keine
	Präservierung		gram -		schwach
			gram +		mittel
					stark



3. Ergebnisse

Einordnung		Gram		Ausprägung	
	Abbau		?		keine
	Präservierung		gram -		schwach
			gram +		mittel
					stark

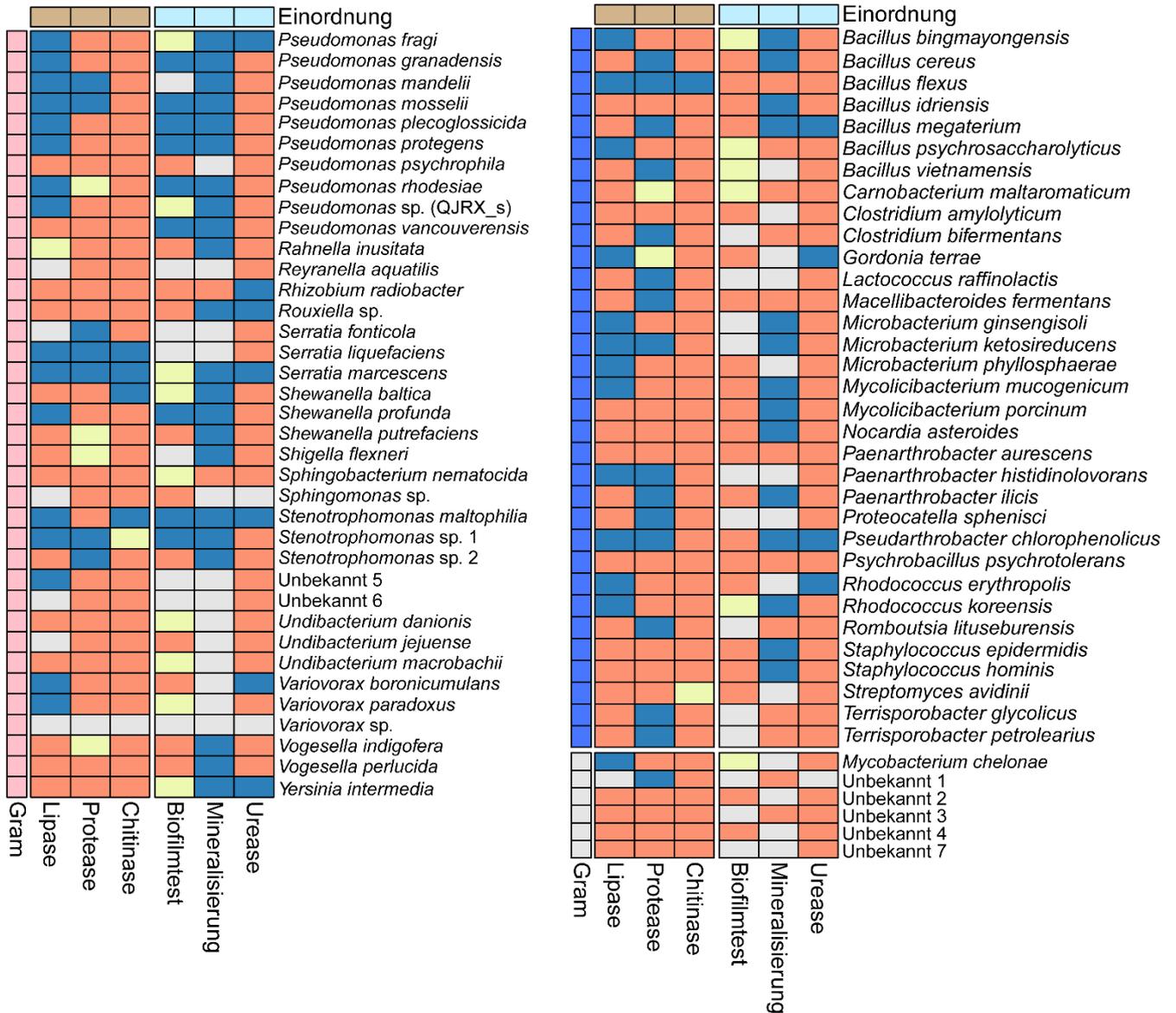


Abbildung 27: Übersicht über die isolierten Organismen und ihre speziellen Eigenschaften. Die Organismen wurden im Zuge der Versuchsreihen mithilfe unterschiedlicher Anzuchtmethoden kultiviert und konserviert und mit verschiedenen Tests auf ihre Charakteristika untersucht. Im Fokus standen hierbei Eigenschaften, die die Präservierung (Urease, Biomineralisierung, Biofilmbildung) oder den Zerfall (Lipase, Protease, Chitinase) des Gewebes begünstigen. Die Bakterien sind anhand ihres Gram-Verhaltens aufgeteilt.

Manche Organismen konnten anhand der ausgewählten Testungen nicht charakterisiert werden. Sie zeigten entweder kein Wachstum auf den speziellen Nährmedien oder keine eindeutigen

3. Ergebnisse

Ergebnisse. Alle Tests wurden mehrfach wiederholt, um die Ergebnisse zu validieren. Bei doppelten Organismen wurden zum Teil die Ergebnisse beider Individuen in die Analyse einbezogen.

Bei insgesamt 111 (63 %) Organismen konnte die Ausbildung degradierender Exoenzyme nachgewiesen werden (siehe Abbildung 28). Während nur 3 (1,7 %) der isolierten Bakterien kein eindeutiges Ergebnis oder kein Wachstum gezeigt haben, waren 62 (35,2 %) Bakterien nicht in der Lage, spezielle abbauende Enzyme zu synthetisieren. Die meisten Organismen (37 %) produzierten eine Lipase, die Fettsäuren von Lipoproteinen abspalten kann. Aber auch Proteasen wurden von 23 % der Organismen ausgebildet. Solche Enzyme katalysieren eine hydrolytische Spaltung von Proteinen und Peptiden und ermöglichen so den Abbau von Gewebe. Seltener konnten die Mikroorganismen Chitin hydrolytisch mit Chitinasen spalten, hier zeigten nur 7 % aller Bakterien ein positives Ergebnis auf den Spezialnährmedien. Manche der isolierten Bakterien haben nicht nur ein Exoenzym produziert, sondern eine Kombination mehrerer Enzyme, um effizient Nährstoffe zu generieren. So wiesen zwischen 3 und 9 % der Spezies mindestens zwei, 19 % sogar alle drei getesteten Enzyme (Chitinase, Protease, Lipase) auf. Damit sind die Organismen in der Lage, verschiedenste Habitate zu besiedeln, da sie variable Substrate verarbeiten und daraus Nährstoffe generieren können.

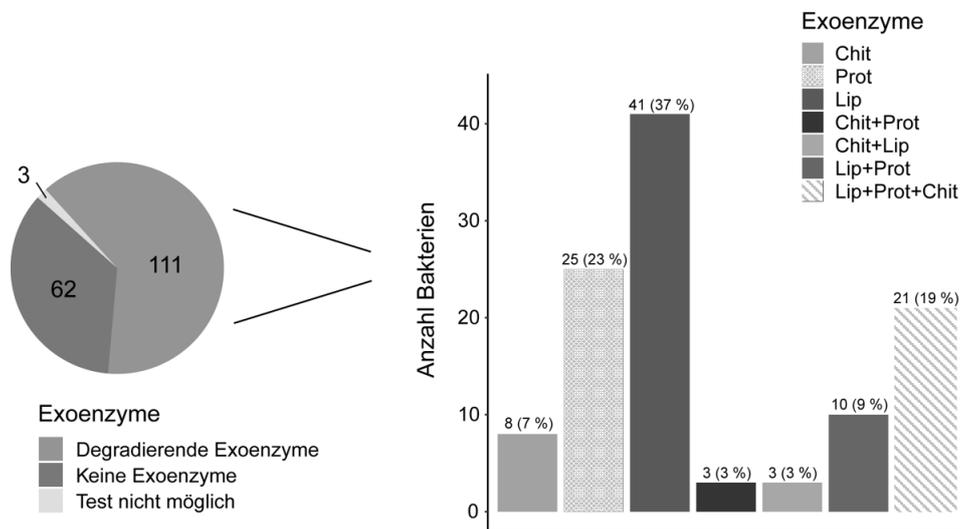


Abbildung 28: Übersicht über die Anzahl der Organismen, die Exoenzyme zum Abbau von Weichgewebe synthetisieren können. Von 176 Organismen konnten 111 Bakterien mindestens ein degradierendes Exoenzym produzieren.

Es wird vermutet, dass sich die Ausbildung eines Biofilms positiv auf die Präservierung von Weichgewebe auswirken kann. Durch die Ummantelung des abgestorbenen, organischen Materials soll zum einen der bakterielle Abbau reduziert werden und zum anderen die geochemischen

3. Ergebnisse

Bedingungen im Inneren des Films so verändert werden, dass eine Mineralisierung begünstigt wird. Das EPS des Biofilms kann als Nukleationskern dienen und unterstützt zudem die Aufkonzentrierung freier Ionen. In Abbildung 29 sind die Ergebnisse der Biofilm- und Mineralisierungsversuche aufgezeigt.

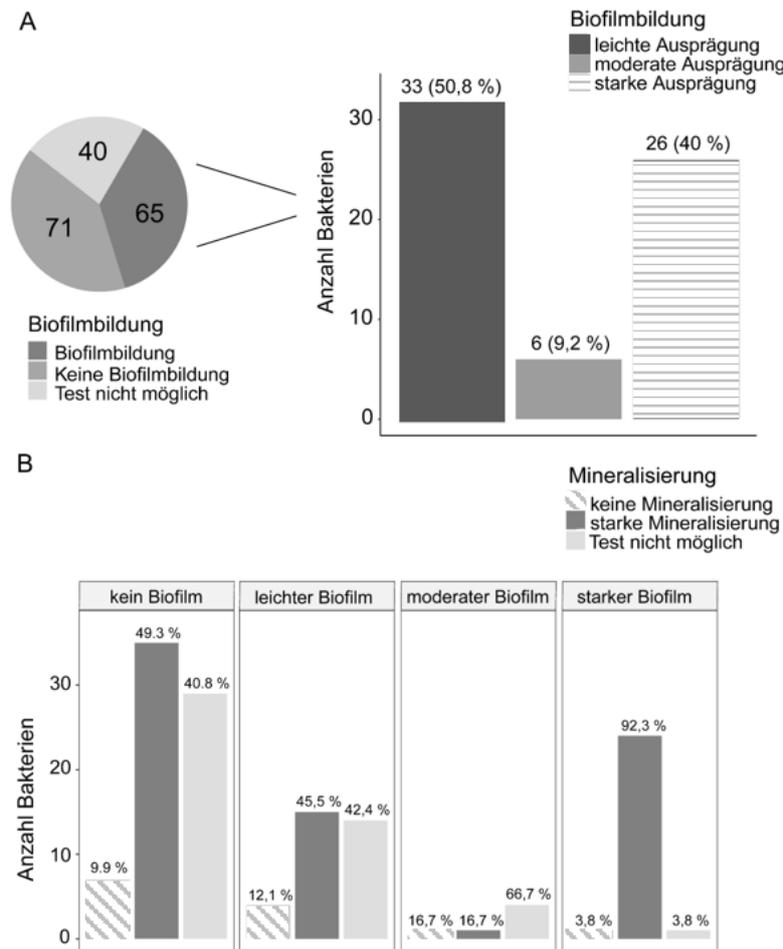


Abbildung 29: Übersicht über die Eigenschaften der isolierten Organismen, die einen Erhalt des Weichgewebes begünstigen können. Sowohl die Ummantelung mit einer Glykokalyx, als auch die Präzipitation von Mineralien kann sich förderlich auf die Präservierung auswirken. A) Darstellung der Fähigkeit einen Biofilm auszubilden, wobei zwischen drei verschiedenen Ausprägungen unterschieden wurde. B) Zuordnung der Biofilm-Synthese zur Bildung von Mineralien, um die Organismen zu identifizieren, die einen Erhalt des Weichgewebes besonders unterstützen würden.

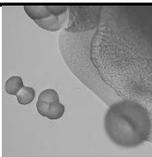
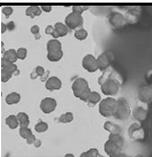
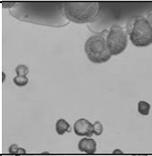
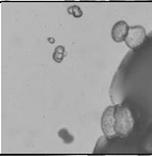
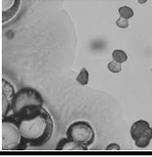
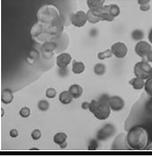
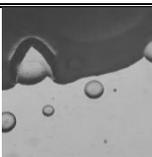
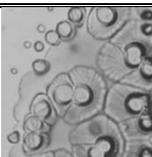
Von den 176 isolierten Organismen haben 65 (37 %) eine Ausbildung von Exopolymerstrukturen in den Polystyrol-Platten in unterschiedlichem Ausmaß gezeigt. Im Gegensatz dazu konnten 71 (40,4 %) der Mikroorganismen keinen sichtbaren Biofilm synthetisieren und bei 40 (22,6 %) Isolatn zeigte sich kein Wachstum bei den ausgewählten Bedingungen. Das Ausmaß der Biofilmbildung war sehr unterschiedlich. Während 49,2 % der Biofilm-positiven Organismen eine starke oder moderate EPS-Bildung aufgewiesen haben, synthetisierten 50,8 % der isolierten Bakterien nur

3. Ergebnisse

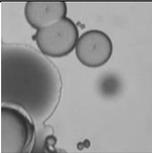
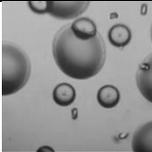
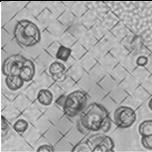
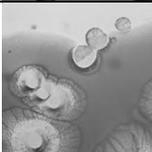
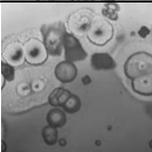
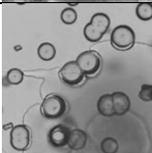
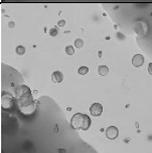
geringe Mengen der Polymerstruktur. Besonders interessant sind Bakterien, die nicht nur einen Biofilm produzieren, sondern zusätzlich auch noch die Fähigkeit aufweisen Mineralisierungsprozesse aktiv oder passiv zu induzieren. Bei den isolierten Mikroorganismen war auffällig, dass die Bakterien, die ein EPS ausbilden können, zu 92,3 % auch eine Mineralisierung auf speziellen Nährmedien zeigten. Insgesamt 49,3 % der Organismen, die ein negatives Testergebnis im Biofilmversuch aufgewiesen haben, regten die Ausfällung von Calciumcarbonat-Strukturen an. In der gleichen Gruppe war bei 40,8 % der Mikroorganismen der Test auf die Mineralisierungsfähigkeit nicht möglich, da die Organismen auf dem speziellen Nähragar nicht wachsen konnten. Zusätzliche Tests in Flüssigmedium zeigten ebenfalls kein Wachstum. Kristallausfällungen konnten bei 45,5 % der Organismen mit einer leichten Biofilmbildung und nur bei einem der Bakterien mit einer moderaten Ausprägung nachgewiesen werden.

Die Organismen prägten auf den speziellen Agarplatten, die mit Calciumacetat versetzt waren, vielfältige Kristallisierungsformen aus (siehe Tabelle 24).

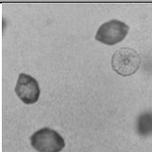
Tabelle 24: Übersicht über die unterschiedlichen Kristallstrukturen, die durch die metabolische Aktivität der isolierten Organismen auf dem speziellen 4 x mB4-Agar gebildet wurden. Zur Darstellung wurden beispielhafte Proben ausgewählt.

Organismus	Kristallstruktur	Organismus	Kristallstruktur
Nierig/Traubig			
<i>Pseudomonas granadensis</i>		<i>Acinetobacter guillouiae</i>	
<i>Aeromonas media</i>		<i>Shewanella baltica</i>	
<i>Citrobacter freundii</i>		<i>Aeromonas media</i>	
Kugelig			
<i>Haemophilus piscium</i>		<i>Rouxiella</i> sp. (MJIB_s)	

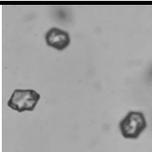
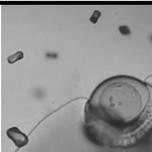
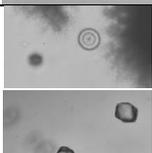
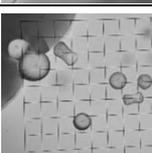
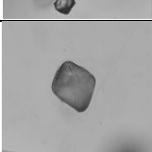
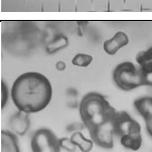
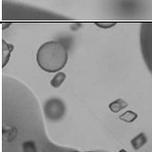
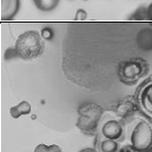
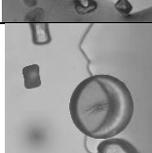
3. Ergebnisse

<i>Pseudomonas protegens</i>		<i>Pseudomonas</i> sp. (QJRX_s)	
<i>Brevundimonas aurantiaca</i>		<i>Aeromonas eucrenophila</i>	
<i>Pseudomonas plecoglossicida</i> NBRC		<i>Aeromonas veronii</i>	
<i>Rahnella inusitata</i>		<i>Paenarthrobacter ilicis</i>	

Dipyramidial

<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>		<i>Mycolicibacterium porcinum</i>	
-------------------------------------	--	-----------------------------------	--

Kombination aus rhomboedrisch, prismatisch und tafelig

<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		<i>Stenotrophomonas</i> sp. (CP016294_s)	
<i>Nocardia asteroides</i>		<i>Rhodococcus koreensis</i>	
<i>Pseudarthrobacter chlorophenolicus</i>		<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	
<i>Brevundimonas intermedia</i>		<i>Enterobacter cloacae</i>	
<i>Shigella flexneri</i>			

3. Ergebnisse

Während auf wenigen Platten lediglich innerhalb der Kolonien mineralisierte Strukturen erkennbar waren, zeigten die meisten Organismen zusätzlich im Bereich rund um die Kolonien Kristalle. Hier wurden die chemischen Bedingungen in der Umgebung der Mikroorganismen verändert, sodass Calciumcarbonat ausfallen konnte. Ein Erscheinungsbild wurde besonders häufig von Organismen verschiedener Genera ausgeprägt und ist in Abbildung 30 dargestellt. Unter dem Binokular waren mittig auf den groß gewachsenen Kolonien plattenartige, matte, helle Einwölbungen zu sehen, wohingegen im Randbereich vermehrt bräunliche, rundliche, glänzende Einschlüsse sichtbar wurden. Außerdem konnten außerhalb der Kolonie im Agar sehr kleine, weiße, rundliche Strukturen nachgewiesen werden.

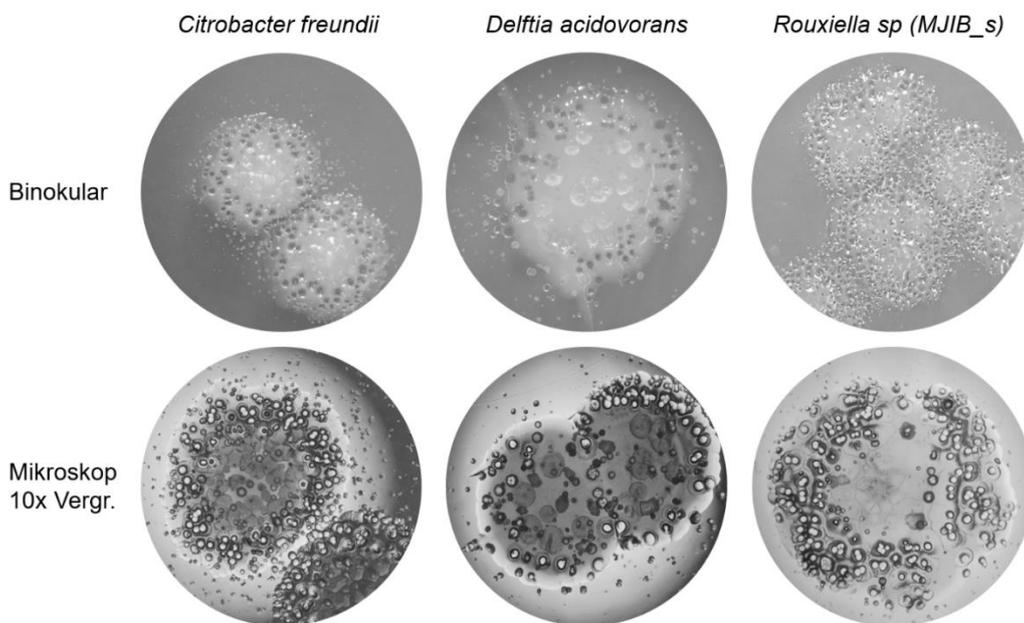


Abbildung 30: Besondere Kristallstrukturen, die auf dem speziellen 4 x mB4-Agar ausgebildet wurden. Beispiellhaft sind drei verschiedene Organismen dargestellt. Die Kristalle weisen eine ähnliche Morphologie auf und variieren innerhalb der Lokalisation auf der Agarplatte.

Vermutlich hängt die Kristallstruktur mit den chemischen Bedingungen, wie dem pH-Wert, im Agar zusammen. Ist die mikrobielle Aktivität sehr hoch, also vor allem innerhalb der Kolonie, verändert sich die Umgebung stärker, als außerhalb. Diese Beobachtung wurde davon gestützt, dass in dem Fall, dass zwei Kolonien sehr nah beieinander lagen, im Zwischenraum der Kolonien vermehrt Einschlüsse nachweisbar waren. Dieses Phänomen ist in Abbildung 31 gezeigt.

3. Ergebnisse

Paenarthrobacter ilicis

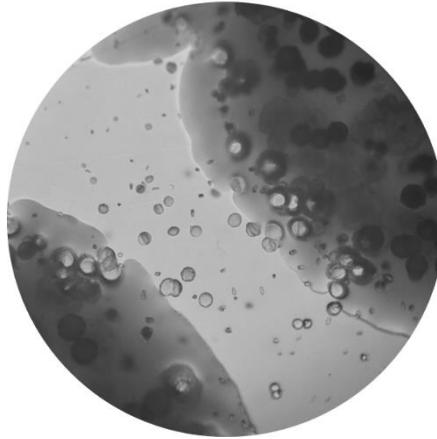


Abbildung 31: Vermehrte Ausbildung von Kristallstrukturen im und auf dem Agar zwischen zwei Bakterienkolonien am Beispiel des Organismus Paenarthrobacter ilicis.

Die chemische Struktur der Einschlüsse auf der Agarplatte wurde mithilfe eines Raman-Spektrometers analysiert. Hierfür wurden mit der 10x oder 100x fachen Vergrößerung auffällige Strukturen ausgewählt und bei einer Wellenlänge von 532 nm analysiert. Dabei wurde nachgewiesen, dass es sich bei den ausgefallenen Produkten um Carbonate bzw. Kalzite gehandelt hat, was in Abbildung 32 gezeigt wird.

3. Ergebnisse

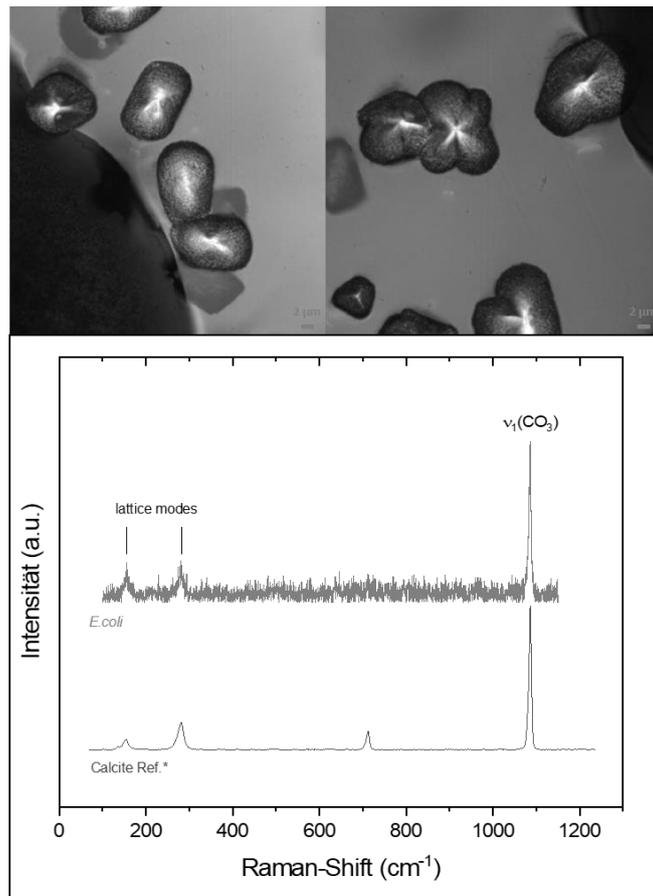


Abbildung 32: Ergebnisse der RAMAN-Spektroskopie der Kristallstrukturen in und auf dem 4 x mB4-Agar zur Analyse der Fähigkeit der Organismen Biominerale aktiv zu präzipitieren oder diesen Vorgang zu induzieren. A) Mikroskopisches Bild der Kristallstrukturen bei einer 10-fachen Vergrößerung. B) RAMAN-Spektrum der Kristallstrukturen mit einem Kalzit-Vergleichsspektrum (RRUFF Database, R050048_Raman_785). Die Spektren wurden mit einem Laser der Wellenlänge 532 nm und einem 100-fachen Objektiv aufgenommen. In blau ist beispielhaft ein RAMAN-Spektrum des Organismus *Escherichia coli* JM83 dargestellt.

4. Diskussion

Bakterien besiedeln die Erdoberfläche vermutlich schon seit dem Abkühlen des Planeten, da erste Fossilfunde auf eine Zeit zwischen 3,5 - 3,8 Ga datiert werden können (Rozanov & Astafieva, 2009). Aus diesem Grund wird davon ausgegangen, dass sie bei der Entstehung der heutigen Fossilien eine große Rolle gespielt haben. Durch verschiedenste Stoffwechselwege wirken die Bakterien sowohl auf den Abbau als auch den Erhalt des Weichgewebes ein. Die Präservierung erfolgt beispielsweise durch Mineralisierungsprozesse, die entweder aktiv oder passiv durch die Stoffwechselprodukte der Mikroorganismen induziert werden. Erste Zerfallsexperimente unter Laborbedingungen konnten nachweisen, dass ein initialer, heterotropher Abbau des Weichgewebes durch Bakterien und die damit verbundenen chemischen Veränderungen in und um das Gewebe eine wichtige Voraussetzung für guten Erhalt darstellen (Naimark *et al.*, 2016a, 2016b, 2018a, 2018b; Petrovich, 2001; Sagemann *et al.*, 1999; Wilson & Butterfield, 2014). Aus diesem Grund wird vermutet, dass der bakterielle Abbau des Gewebes an einem bestimmten Punkt reduziert oder verhindert werden muss, damit die präservierenden Prozesse überwiegen. Obwohl Bakterien in der Lage sind, extreme Umweltfaktoren zu tolerieren und ihre metabolische Aktivität an wechselnde Bedingungen anzupassen, können manche abiotische Faktoren die bakterielle Aktivität verringern. Die genauen Bedingungen, die die bakterielle Aktivität beeinflussen und dazu führen, dass das instabile Weichgewebe, das normalerweise sehr anfällig für Zerfall ist, erhalten bleibt, sind bisher noch nicht ausreichend erforscht (Purnell *et al.*, 2018). Hierbei wurde insbesondere die exakte Rolle der einzelnen Bakterien und ihr Ursprung vernachlässigt. Eine Aufklärung der unbekannt abiotischen und biotischen Parameter kann anhand von durchdachten, taphonomischen Experimenten erreicht werden (McMahon *et al.*, 2016; Newman *et al.*, 2019; Purnell *et al.*, 2018; Sagemann *et al.*, 1999). Allerdings ist zu beachten, dass nicht zu viele unbekannte Parameter parallel untersucht werden, da ansonsten keine Fragen geklärt, sondern neue Unbekannte geschaffen werden (Purnell *et al.*, 2018). Dadurch, dass die entscheidenden Schritte zu einem gut erhaltenen Fossil oder zu einem effektiven Abbau des Gewebes vermutlich innerhalb von wenigen Tagen bis einigen Monaten ablaufen, sind Studien unter kontrollierten Laborbedingungen möglich (Briggs & McMahon, 2016; Newman *et al.*, 2019; Sagemann *et al.*, 1999). Die Studien, die bisher durchgeführt wurden, um die Präservierung von Weichgewebe aufzuklären, waren bis auf wenige Ausnahmen (Mähler *et al.*, 2020; Naimark *et al.*, 2016b; Peterson *et al.*, 2010) hauptsächlich auf marine

Habitat limitiert (Briggs & Kear, 1993a, 1993b, 1993c, 1994; Butler *et al.*, 2015; Eagan *et al.*, 2017; Hof & Briggs, 1997; Martin *et al.*, 2005; Naimark *et al.*, 2018b; Raff *et al.*, 2008; Raff *et al.*, 2014; Sagemann *et al.*, 1999). In diesem Projekt wurden acht verschiedene Versuchsreihen mit unterschiedlichen Parametern (siehe Tabelle 19) zur Analyse des bakteriellen Einflusses auf den Abbau und den Erhalt von Weichgewebe in Süßwasser durchgeführt. Es sollte untersucht werden, welche abiotischen Faktoren zu einer Reduktion der mikrobiellen Abbaurate und einer verstärkten Mineralisierung führen können.

4.1. Versuchsreihen

4.1.1. Kontrollen

Zu Beginn einer großangelegten 16S-rRNA-Amplikon-Analyse sollte die ausgewählte Methodik auf potentielle Fehlerquellen überprüft werden. Während der DNA-Extraktion, der Amplifikation der 16S-rRNA-Gensequenzen oder des gesamten Sequenzierprozesses können durch die verwendeten Chemikalien oder Geräte potentiell Kontaminationen eingeführt werden, die die Interpretation der Daten beeinflussen (Grahm *et al.*, 2003; McAlister *et al.*, 2002; McFeters *et al.*, 1993; Shen *et al.*, 2006). Die einzelnen Bakterien weisen große Unterschiede in ihrem Aufbau auf, wobei vor allem die verschiedenen Zellhüllen und ihre Zusammensetzung einen Einfluss auf den Aufreinigungsprozess haben können. Kann die Zellwand nicht richtig lysiert werden, wird keine DNA freigesetzt und das Bakterium wird in der Analyse der Bakteriengemeinschaft nicht betrachtet (Ma *et al.*, 2020; Pollock *et al.*, 2018). Wichtige bakterielle Gruppen könnten so unwissentlich ausgeschlossen und ihr Einfluss auf gewisse Prozesse unterschätzt werden. Zu diesem Zweck wurde das ausgewählte Kit zur DNA-Extraktion zum einen mit einer bekannten Mock-Gemeinschaft (Zusammensetzung siehe Tabelle 8) und zum anderen mit Leerproben getestet. Die Ergebnisse der Mock-Analyse zeigten (siehe Abbildung 11), dass zwei Gram-positive Organismen (*Lactobacillus* sp., *Staphylococcus* sp.) und ein Gram-negatives Bakterium (*Escherichia* sp.) unterhalb der erwarteten Häufigkeit vorlagen. Yuan *et al.* (2012) hatten ebenfalls Schwierigkeiten die erwartete Menge an *Escherichia* sp. zu detektieren. Gram-positive Organismen sind aufgrund ihrer dickwandigen Zellwand deutlich schwerer zu lysieren als Gram-negative Organismen, was durch verschiedene andere Mock-Analysen bestätigt wird (Hughes *et al.*, 2017; Song *et al.*, 2021; Yang *et al.*, 2020; Yuan *et al.*, 2012). Besonders herausfordernd ist die Zellyse von Staphylokokken bei

denen eine Modifikation der Muraminsäurereste die Aktivität von Lysozym hemmt (Bera *et al.*, 2005), was jedoch durch eine erweiterte enzymatische Behandlung mit Lysostaphin, Mutanolysin und Lysozym verbessert werden kann (Yuan *et al.*, 2012). Auch *Lactobacillus* sp. scheinen je nachdem in welcher Wachstumsphase sie vorliegen, schwieriger aufzubrechen zu sein. Andere Organismen wurden durch das verwendete Kit dagegen in ihrer erwarteten Häufigkeit übertroffen. Dazu gehörten *Enterococcus* sp., *Bacillus* sp. und *Listeria* sp. (alle Gram-positiv). Dies konnte unter anderem mit dem verwendeten Kit (ZymoBIOMICS DNA Miniprep Kit) auch in anderen Studien bereits beobachtet werden (Hughes *et al.*, 2017; Janssen *et al.*, 2021; Ojo-Okunola *et al.*, 2020). *Bacillus* sp. gehören zwar zu den Gram-positiven Organismen, verändern aber in späteren Wachstumsphasen den Aufbau ihrer Zellwand („Gram-labil“), sodass sie dann vergleichbare Eigenschaften zu Gram-negativen Bakterien aufweisen (Li *et al.*, 2018a; Logan & de Vos, 2015). Neben den eingesetzten Organismen konnten zehn weitere Genera in den Proben nachgewiesen werden. Alle Organismen waren dabei weniger als 1 % in der Probe vorhanden, lediglich *Enterobacter* sp. machte eine Menge von bis zu 3,5 % des gesamten Mikrobioms aus. *Enterobacter* sp. wurden bereits als Biomarker für Kontaminationen im Laborumfeld eingestuft und mehrfach in 16S-Amplikon-Analysen als Verunreinigung in Reagenzien oder Verbrauchsmaterial detektiert (Janssen *et al.*, 2021; Li *et al.*, 2018b; Salter *et al.*, 2014; Wally *et al.*, 2019). Um mögliche Fehlinterpretationen zu minimieren, wurde der Schwellenwert für die weiteren Analysen auf 1 % gesetzt. Alle Organismen, die seltener in der Probe vorlagen, wurden als mögliche Kontamination betrachtet. Replik 2 der Mock-Analyse machte zudem deutlich, dass die Verwendung von Triplicaten zur Vermeidung von zufälligen Verteilungen in den Versuchsreihen sinnvoll ist. Während Replik 1 und Replik 3 eine sehr ähnliche bakterielle Verteilung zeigten, waren die Ergebnisse von Replik 2 deutlich anders und wurden für die weitere, detaillierte Analyse ausgeschlossen.

Zusätzlich zu den Mock-Analysen wurden ebenfalls drei Leerproben auf ihre bakterielle Zusammensetzung untersucht. Hierbei wurden 22 Genera detektiert, von denen fünf Organismen deutlich dominierten (siehe Abbildung 12). All diese Bakterien wurden zuvor in verschiedenen Studien als Kontamination in Chemikalien, Reagenzien oder Laborequipment nachgewiesen (Glassing *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2018b; Salter *et al.*, 2014; Wally *et al.*, 2019; Weyrich *et al.*, 2019). Eingebraachte Verunreinigungen wirken sich besonders auf Proben mit einer geringen Biomasse aus, da sie zum Teil die Menge der endogenen Bakterien übertreffen (Brandt & Albertsen, 2018; Glassing *et al.*, 2016; Quince *et al.*, 2017; Salter *et al.*, 2014; Weyrich *et al.*, 2019). Insbesondere am Ende der Versuchsreihen waren die Gewebeproben oftmals sehr zersetzt, sodass die Ausbeute

der DNA-Aufreinigung sehr niedrig war. Die Konzentration der Wassernullproben, bei denen lediglich 50 ml gefiltert wurden, lag ebenfalls in den meisten Proben unterhalb von 10 ng/ μ l, womit die Proben eindeutig eine geringe Biomasse aufwiesen. Aus diesen Gründen sollte eine Interpretation der Daten sehr vorsichtig erfolgen und insbesondere der Einfluss der zuvor beschriebenen Organismen hinterfragt werden. Neben einer sehr sauberen und ordentlichen Arbeitsweise, sollten zusätzlich dazu in allen Versuchsreihen Leerkontrollen verwendet werden

4.1.2. Mikrobiom der Flusskrebse

Obwohl Flusskrebse (Familie: Cambaridae, Ordnung: Decapoda, Klasse: Malacostraca) eine große Rolle für das ökologische Gleichgewicht in Frischwassersystemen spielen und sie als Verwerter viele Nährstoffe zurück in den Kreislauf einführen (Creed & Reed, 2004; Momot, 1995), ist über ihre bakterielle Besiedelung kaum etwas bekannt. Um das Mikrobiom der verwendeten *Cambarellus diminutus* vergleichen zu können, wurden verschiedene Studien zu Mitgliedern der Decapoda verwendet, obwohl diese zum Teil phylogenetisch weiter auseinanderliegen. Ein Vergleich der detektierten Genera mit der Literatur ist in Tabelle 25 aufgezeigt. Außerdem muss beachtet werden, dass in den durchgeführten Versuchsreihen das ganze Tier für die DNA-Extraktion eingesetzt wurde, wohingegen in den meisten Studien lediglich Bereiche des Gastrointestinaltrakts untersucht wurden. Die Besiedelung verschiedener Körperbereiche, wie zum Beispiel Kiemen und Darm, scheint unterschiedlich zu sein (Zhang *et al.*, 2016), was in unserem Versuchsaufbau nicht berücksichtigt werden konnte, da die Tiere nach kürzester Zeit stark zersetzt waren.

4. Diskussion

Tabelle 25: Vergleich der Genera, die zu Beginn der Versuchsreihen im Gewebe von *C. diminutus* nachgewiesen werden konnten, mit der Literatur zu Individuen der Ordnung Decapoda.

Familie	Genus	Vergleichstier / Studie	Quelle
Comamonadaceae	<i>Hydrogenophaga</i> <i>Sphaerotilus</i>	Kiemenbereich von <i>Cambarus sciotensis</i> Symbionten von <i>Daphnia</i> Auf der Haut von Amphibien Darm von <i>Neocardina denticulata</i> Darm von <i>Litopenaeus vannamei</i> (postlarval)	Skelton <i>et al.</i> , 2017 Freese & Schink, 2011; Qi <i>et al.</i> , 2009 Kueneman <i>et al.</i> , 2014; McKenzie <i>et al.</i> , 2012 Cheung <i>et al.</i> , 2015 Huang <i>et al.</i> , 2016
Chitinophagaceae	<i>Cnuella</i>	Kiemenbereich von <i>Cambarus sciotensis</i>	Skelton <i>et al.</i> , 2017
Rhodobacteraceae	<i>Rhodobacter</i>	Darm von <i>Neocardina denticulata</i> Darm von <i>Penaeus monodon</i> Darm von <i>Macrobrachium nipponense</i>	Cheung <i>et al.</i> , 2015 Rungrassamee <i>et al.</i> , 2014 Tzeng <i>et al.</i> , 2015
Flavobacteriaceae	<i>Flavobacterium</i>	Darm von <i>Neocardina denticulata</i> Darm von <i>Litopenaeus vannamei</i> (adult)	Cheung <i>et al.</i> , 2015 Huang <i>et al.</i> , 2016
Aeromonadaceae	<i>Aeromonas</i>	Darm von <i>Penaeus monodon</i> Darm von <i>Macrobrachium nipponense</i> Darm kranker <i>Litopenaeus vannamei</i>	Rungrassamee <i>et al.</i> , 2014 Tzeng <i>et al.</i> , 2015 Huang <i>et al.</i> , 2016
Mycoplasmataceae	<i>Candidatus</i> Bacilloplasma	Dünndarm der Kellersassel <i>Porcellio scaber</i> Darm von <i>Procambarus clarkii</i> Darm von <i>Cambarellus diminutus</i>	Kostanjšek <i>et al.</i> , 2007 Zhang <i>et al.</i> , 2020 Vorversuche; unpublizierte Daten

Generell lässt sich vermuten, dass die mikrobielle Besiedelung durch verschiedenste Parameter beeinflusst wird. Neben den Entwicklungsstufen (Cheung *et al.*, 2015; Huang *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2020), scheinen auch die Umgebung und das Nahrungsangebot einen großen Einfluss zu haben (Holt *et al.*, 2020; Hou *et al.*, 2018; Landsman *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2020). Zwei Wochen nach Beendigung des Larvenstadiums wurde der Darm von *Litopenaeus vannamei* von Comamonadaceae dominiert, wohingegen sich in späteren Entwicklungsstadien Flavobacteriaceae und Vibrionaceae durchsetzen konnten (Huang *et al.*, 2016). Zhang *et al.*, (2020) haben eine Korrelation zwischen der Entwicklung der Tiere und der aufgenommenen Nahrung aufgezeigt. Erst wenn die Scheren vollständig ausgebildet sind, können adulte *Procambarus clarkii* jagen und ihre omnivore Lebensweise voll ausprägen. Zusätzlich dazu scheint das Häutungsstadium Einfluss auf das instabile Mikrobiom der Flusskrebse zu nehmen (Zhang *et al.*, 2020). Bei mikrobiellen Analysen des Gewebes von *Litopenaeus vannamei* und *Penaeus penicillatus* und des umliegenden Milieus (Wasser, Sediment) in Garnelenfarmen konnte kaum ein Unterschied in den bakteriellen Taxa nachgewiesen werden, sodass davon ausgegangen wurde, dass extrinsische

Bakterien die Besiedelung am Meisten beeinflussen (Hou *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2014). Oftmals sind die vorkommenden Taxa in der Umgebung und den Organismen zwar identisch, allerdings in unterschiedlicher Häufigkeit. Andere Studien gehen davon aus, dass die Umgebung nur einen geringen Einfluss hat und die bakterielle Besiedelung Spezies-spezifisch ist (Tang *et al.*, 2021; Tzeng *et al.*, 2015).

In diesem Projekt wurde zu Beginn jeder Versuchsreihe die bakterielle Zusammensetzung von drei einzelnen Individuen untersucht (siehe Abbildung 16). Zwar scheinen bestimmte Genera, wie *Aeromonas*, *Candidatus Bacilloplasma* oder *Hydrogenophaga*, in allen Proben vorzukommen, die Häufigkeit ist hierbei jedoch unterschiedlich. Teilweise war die Zusammensetzung zwischen den unterschiedlichen Tieren (biologische Replikate) ähnlich, allerdings zeigten die Individuen in manchen Versuchsreihen auch große Unterschiede. Eine ähnliche Beobachtung konnten auch Landsman *et al.* (2019) in ihren Replikaten beobachten. Dabei wird deutlich, dass neben den äußeren Faktoren, wie der Nahrung und der Umgebung, auch die Individualität jedes einzelnen Organismus nicht außer Acht gelassen werden sollte. Wie im vorherigen Abschnitt beschrieben, spielen vielfältige Faktoren bei der mikrobiellen Besiedelung der Decapoda eine Rolle. Durch die Erstellung einer Zucht sollten gewisse Parameter kontrollierbarer werden. So wurden alle Tiere mit dem gleichen Futter versorgt und im gleichen Wasser mit dem gleichen Sediment aufgezogen. Da eine einzelne Spezies verwendet wurde, sollten Faktoren wie die Spezies-spezifische Besiedelung vernachlässigbar sein. Was jedoch nur bedingt beachtet werden konnte, waren das Geschlecht und die Entwicklungsstadien der Tiere, da oftmals mehr Individuen gebraucht wurden, als adulte Tiere vorhanden waren. In anderen Studien konnte nachgewiesen werden, dass die Entwicklungsstufe oder das Geschlecht der toten Organismen die mikrobielle Besiedelung (García *et al.*, 2020) und damit einhergehend den Zerfall (Kear *et al.*, 1995; Raff *et al.*, 2006) und die Mineralisierung des Gewebes (Inoue *et al.*, 2004; Mähler *et al.*, 2020) beeinflussen. Während jedoch bei Zerfallsexperimenten mit menschlichen Kadavern auch im Verlauf des Abbaus eine unterschiedliche mikrobielle Besiedelung der einzelnen Individuen beobachtet werden konnte (DeBruyn & Hauther, 2017), entwickelte sich die mikrobielle Zusammensetzung in den biologischen Replikaten in den Versuchsreihen hier ähnlich, weswegen Tendenzen analysiert werden konnten.

4.1.3. Verlauf der mikrobiellen Gemeinschaft in den Versuchsreihen

In der paläontologischen Forschung wurden zahlreiche Fossilfunde analysiert und deren mineralogische Zusammensetzung aufgeklärt. Der Prozess, der zu einer Fossilisation von Weichgewebe führt, ist allerdings nahezu unbekannt und besonders der Einfluss der bakteriellen Aktivität und die Veränderung dieser bezogen auf abiotische Parameter wurde bislang wenig erforscht. Nachdem ein Organismus tot ist, startet innerhalb kürzester Zeit der enzymatische Abbau, der Autolyse genannt wird. Erst nach ungefähr 24 h spielen Bakterien eine dominante Rolle in den Zerfallsprozessen, indem sie erst die einfachen Produkte der Autolyse verstoffwechseln und im Anschluss komplexere Moleküle aufspalten (Carter & Tibbett, 2006; Gibbons & Reed, 1930; Singhal *et al.*, 1992; Vass, 2001). Die Zusammensetzung der Bakteriengemeinschaft während der Zerfallsprozesse ist dynamisch und ändert sich stetig, angetrieben durch Konkurrenz um Nährstoffe und Lebensraum unter den sich ändernden abiotischen Bedingungen.

In diesem Projekt wurden acht Versuchsreihen durchgeführt, in denen bestimmte abiotische Parameter verändert (siehe Tabelle 19), und der Verlauf der bakteriellen Besiedelung und die optischen Veränderungen des Weichgewebes dokumentiert wurden. Die unterschiedliche Besiedelung von Mikroorganismen während des Zerfalls von Weichgewebe wurde detailliert bisher nur in der forensischen Wissenschaft untersucht, wobei der Fokus der Experimente auf dem bakteriellen Abbau in terrestrischen Habitaten lag (z.B. Benbow *et al.*, 2015; Bolyen *et al.*, 2019; Crippen *et al.*, 2015; Dickson *et al.*, 2011; Metcalf *et al.*, 2013; Pechal *et al.*, 2014). Generell kann davon ausgegangen werden, dass der Abbau von Kadavern in aquatischer Umgebung deutlich anders abläuft, da verschiedenste Variablen (Temperatur, Wassertiefe, chemische Parameter, Salinität) auf das Gewebe und insbesondere die mikrobielle Gemeinschaft einwirken (Dickson *et al.*, 2011). Da die Studienlage jedoch gering ist, wurden die Ergebnisse der Versuchsreihen mit allen vorhandenen Publikationen verglichen, ohne dass zwischen terrestrischen und aquatischen Habitaten unterschieden wird. Hierbei sollten die Vergleiche aus den zuvor genannten Gründen vorsichtig erfolgen.

Die abiotischen Parameter, die zwischen den Zerfallsexperimenten verändert wurden, sollten Veränderungen in der mikrobiellen Gemeinschaft und damit einhergehend ein verändertes Abbauverhalten hervorrufen. So wurden neben unterschiedlichen Sauerstoffbedingungen (aerob und anaerob), der Einfluss von extrinsischen Bakterien (unbehandeltes und autoklaviertes Seewasser) und zwei verschiedene Temperaturen (4 °C und 24 °C) untersucht. Generell wird angenommen, dass kalte Temperaturen zu einer Abnahme des Zerfalls und dadurch besseren Erhalt führen, da die bakteriellen Enzyme bei diesen Bedingungen deutlich weniger Substrat umsetzen können

(Montuelle & Volat, 1997). Verschiedenste Fossilfunde im Permafrostboden, bei denen selbst labile Biomoleküle, wie DNA-Bausteine, noch nachgewiesen werden konnten, unterstützen diese Beobachtung (Kharlamova *et al.*, 2016; Papageorgopoulou *et al.*, 2015; Schwarz *et al.*, 2009). In unseren Versuchsreihen konnte neben dem Zerfall des Gewebes ein Anstieg der Calciumkonzentration (vgl. Mähler, 2021) im umgebenden Wasser demonstriert werden, was eindeutig zeigt, dass bakterielle Aktivität stattgefunden hat. Nur wenige bakterielle Spezies haben eine Wachstumsobergrenze bei 20 °C und werden als psychrophil bezeichnet (Optimum: 12 - 15 °C). Diese psychrophilen Bakterien weisen spezielle Anpassungen in ihrem Stoffwechsel und ihren Enzymstrukturen auf (D'Amico *et al.*, 2002; Gerday, 2013). Neben den speziell angepassten Organismen, zeigen einige Organismen, wie *Aeromonas* sp., auch eine erhöhte Toleranz gegenüber niedrigen Temperaturen (psychrotolerant, Wachstum zwischen 3 und 35 °C möglich). In den durchgeführten Versuchsreihen konnten nur wenige psychrophile, dafür mehr psychrotolerante Organismen nachgewiesen werden. In Zerfallsexperimenten mit Schweinekadavern und Schafsknochen konnte ein zweifach erniedrigter Abbau durch Herabsenken der Temperatur von ~21 °C auf ~10 °C detektiert werden (Benbow *et al.*, 2015; Carter & Tibbett, 2006). In kaltem Wasser (11 °C) wurde auch das Rückgrad des Seesterns *Arbacia punctulata* deutlich langsamer abgebaut (Kidwell & Baumiller, 1990). In den in diesem Projekt durchgeführten Versuchsreihen waren bei einer Temperatur von 24 °C alle untersuchten Organe der Flusskrebse nach vier Tagen nicht mehr differenzierbar, wohingegen in den Versuchsreihen 3, 4 und 8 (alle 4 °C) die Muskeln, die Ganglien und der Darm sogar am Ende des Experiments noch intakt waren. Zusätzlich dazu wurden auch die Kiemen, Scheren, das Pleon und der Cephalothorax in sterilem Wasser bei 4 °C (V4 aerob, V8 anaerob) erst nach 77 Tagen abgebaut.

In verschiedenen Zerfallsexperimenten, die zu unterschiedlichen Jahreszeiten durchgeführt wurden, konnte eine signifikant andere mikrobielle Zusammensetzung je nach Temperatur nachgewiesen werden (Benbow *et al.*, 2015), wohingegen in unseren Versuchsreihen unabhängig von der Umgebungstemperatur ähnliche Organismen in unterschiedlicher Menge dominierten. In allen Versuchsreihen machten zu Beginn der Experimente die Proteobakterien die größte Menge der bakteriellen Gemeinschaft aus. Über den Versuchsverlauf nahm diese Gruppe ab und Mitglieder des Phylums Firmicutes konnten verstärkt nachgewiesen werden. Zusätzlich dazu konnte ab Tag 7 unter warmen, bzw. Tag 49 unter kalten Bedingungen, ein unterschiedlich starker Anstieg an Bacteroidetes verzeichnet werden. Eine ähnliche Abfolge der Phyla wurde auch in anderen Zerfallsexperimenten beschrieben (Benbow *et al.*, 2015; Pechal *et al.*, 2014), obwohl Metcalf *et al.* (2013)

im Abdomen eingegrabener Mäuse in der frühen Abbauphase Firmicutes und im späteren Verlauf Proteobacteria als dominante Phyla identifizieren konnten. Nach sieben Tagen verändert sich die bakterielle Flora in den Zerfallsexperimenten oftmals, da die Menge der Nährstoffe abnimmt und alternative Stoffwechselwege genutzt werden, um Energie zu generieren (Burcham *et al.*, 2019). Diese Beobachtung wurde von den Versuchsreihen 1 (aerob, 24 °C, unsteriles Seewasser), 5 (anaerob, 24 °C, unsteriles Seewasser), 6 (anaerob, 24 °C, steriles Seewasser) nach sieben Tagen und Versuchsreihe 3 (aerob, 4 °C, unsteriles Seewasser) nach 21 Tagen gestützt. Bei der Verwesung von größeren Säugetieren oder Menschen steigt die Menge der anaeroben Organismen vor allem im Bereich des Gastrointestinaltraktes während der Aufblähphase an und die Gasproduktion nimmt zu (Crippen *et al.*, 2015). Bei den Flusskrebse konnte nur in Versuchsreihe 1 (aerob, 24 °C, unsteriles Seewasser) eine Anhäufung von Gasen im Kiemenbereich ab Tag 14 dokumentiert werden. Die Ansammlung von Gasen in diesem Bereich führte dazu, dass am Ende des Versuches der Cephalothorax vom Abdomen getrennt vorlag, was auch in anderen Zerfallsexperimenten gezeigt werden konnte (Briggs & Kear, 1993c). Bei Menschen und größeren Säugetieren kann es im Zuge der Gasanhäufung zu einem Aufplatzen der Körperhöhle kommen (Mähler *et al.*, 2015). Durch den Sauerstoffeinstrom und die Öffnung nach außen, können extrinsische Bakterien an der Zersetzung teilnehmen, wodurch die Menge der strikt anaeroben Bakterien kurzzeitig wieder abnimmt und fakultativ anaerobe oder aerobe Organismen die Verwesungsprozesse für eine gewisse Zeit übernehmen (Metcalf *et al.*, 2013). Am Ende dominieren dann wieder anaerobe Bakterien. Generell gilt aber, dass eine Abfolge von aeroben zu anaeroben Bakterien über den Zerfallsprozess erfolgt (Burcham *et al.*, 2016; Hyde *et al.*, 2013; Janaway *et al.*, 2009; Pechal *et al.*, 2014). In unseren Versuchsreihen war kein zwei-phasiger Verlauf zu erkennen und die obligat anaeroben Bakterien nahmen sukzessive zu. Sowohl die bioinformatischen Vorhersagen (siehe Abbildung 23), als auch die dominanten Genera (siehe Abbildung 18 - Abbildung 21) unterstützen diese Beobachtung.

Die Diversität der mikrobiellen Gemeinschaft war in den Versuchsreihen 1 (aerob, 24 °C, unsteriles Seewasser), 3 (aerob, 4 °C, unsteriles Seewasser) und 7 (anaerob, 4 °C, unsteriles Seewasser) zu Beginn der Versuche höher (> 3), was durch die diverse Flora des Seewassers erklärt werden kann. In allen Versuchsreihen nahm die Diversität jedoch nach Beginn der Versuche stark ab. Unter wärmeren Bedingungen (24 °C, V1, V2, V5) stieg sie ab Tag 4 wieder bis auf Werte zwischen 2 und 3 an, blieb jedoch unter dem Niveau der Startbedingungen. Nur in Versuchsreihe 6 (anaerob, 24 °C, steriles Seewasser) war die bakterielle Gemeinschaft ab dem 2. Tag in gleichem Ausmaß divers (~ 1,25). Generell dominieren auch in Zerfallsexperimenten mit Säugetieren im

späteren Verlauf meistens einige wenige Genera, die sich an die schnell wechselnden Bedingungen im Zerfallsprozess anpassen und das unterschiedliche Nahrungsangebot gut nutzen können (DeBruyn & Hauther, 2017). Eine Abnahme in der Diversität über den gesamten Verlauf des Abbaus von Weichgewebe konnte auch in anderen experimentellen Studien nachgewiesen werden (Liu *et al.*, 2021). Im Gegensatz zu den von uns durchgeführten Versuchsreihen konnte hier jedoch zuerst ein Anstieg in der Diversität verzeichnet werden, da das große Nahrungsangebot zu Beginn des Abbaus das Wachstum unterschiedlichster Mikroorganismen förderte (Burcham *et al.*, 2019; Guo *et al.*, 2016).

In den Versuchsreihen 4 (aerob, 4 °C, steriles Seewasser) und 8 (anaerob, 4 °C, steriles Seewasser) nahm die Diversität von Tag 1 bis Tag 21 von 3 auf unter 1 stark ab, da hier im weiteren Versuchsverlauf lediglich eine Gattung der Klasse γ -Proteobacteria dominierte (siehe Abbildung 21). Die Krebse wurden nahezu ausschließlich von *Aeromonas* sp. besiedelt, die zur Familie Aeromonadaceae gehören. Als fakultativ anaerobe Organismen sind sie in der Lage, vielfältige Lebensräume, wie beispielweise Süß- und Salzwasser, Sediment oder verschiedene Organismen (Talagrand-Reboul *et al.*, 2017), zu besiedeln. Sie spielen eine große Rolle im Abbau von Kadavern in Frisch- und Brackwasser und dienen dadurch der Diagnose eines Ertrinkungstods (Huys *et al.*, 2012; Uchiyama *et al.*, 2012). Die Dominanz dieser Gattung in Frischwassersystemen kann durch die Ergebnisse dieser Arbeit eindeutig bestätigt werden. Außerdem sind sie opportunistische Pathogene und können in Fischen oder Flusskrebsen tödliche Krankheiten hervorrufen (Jiravanichpaisal *et al.*, 2009; New, 1995; Talagrand-Reboul *et al.*, 2017; Wiklund & Dalsgaard, 1998). Neben ihrer hohen Sauerstofftoleranz, weisen einige Spezies innerhalb der Gattung ebenfalls Wachstum bei unterschiedlichsten Temperaturen (4 - 42 °C) auf (Hoel *et al.*, 2018; Hudson & Mott, 1993; Knöchel, 1990). Als mesophil können z.B. Typstämme von *Aeromonas hydrophila*, als psychrophil Typstämme der Spezies *Aeromonas salmonicida* eingeordnet werden (Percival & Williams, 2014). Ihre Enzyme sind auf kältere Bedingungen spezialisiert und dadurch in der Lage, Gewebe trotz niedriger Temperaturen zu zersetzen und Nährstoffe zu generieren. Bei den mesophilen Spezies, wie *A. hydrophila*, scheint sich die Infektiosität durch erniedrigte Temperaturen dagegen zu verringern, da vermutlich unter kalten Bedingungen weniger Exotoxine produziert werden können oder deren Aktivität verringert ist (Jiravanichpaisal *et al.*, 2009). Insgesamt ist die metabolische Aktivität aller *Aeromonas* sp. bei niedrigen Temperaturen deutlich verringert (Cavari *et al.*, 1981), was auch den besseren Erhalt des Weichgewebes in den Versuchsreihen 4 (aerob, 4

°C, steriles Seewasser) und 8 (anaerob, 4 °C, steriles Seewasser) erklären kann (siehe Abbildung 21).

Die breite Sauerstoff- und Temperaturtoleranz dieser Gattung spiegelt sich im ubiquitären Vorkommen unter allen abiotischen Bedingungen in den durchgeführten Versuchsreihen wider. Während die *Aeromonaden* in unsterilem Wasser bei allen Temperaturen vor allem zu Beginn der Versuchsreihen vorlagen (V1, V3, V5, V7; siehe Abbildung 18, Abbildung 20), zeigten sie unter wärmeren Bedingungen und in sterilem Wasser (V2, V6) einen zwei-phasigen Verlauf (siehe Abbildung 19). Sie dominierten zu Beginn, nahmen dann ab, um nach einem kurzen Anstieg der Clostridien, bis zum Tag 14 erneut stark zuzunehmen. Möglicherweise können sich die *Aeromonas* Spezies gegen die extrinsische Flora, die durch das unsterile Seewasser (V1, V3, V5, V7) eingeführt wird, langfristig nicht durchsetzen und werden durch besser angepasste Organismen verdrängt. Solche effektiven, finalen Destruenten scheinen im sterilen Versuchsaufbau (V2, V6) zu fehlen, sodass die *Aeromonaden* nach einem kurzen Aufkommen der Clostridien erneut dominieren können. Besonders in den Versuchsreihen 4 (aerob, 4 °C, steriles Seewasser) und 8 (anaerob, 4 °C, steriles Seewasser) beherrschten *Aeromonas* sp. den gesamten Versuchsverlauf. Es kann vermutet werden, dass die extreme Dominanz dieses Genus, das sich schon nach sieben Versuchstagen komplett durchsetzt, das Wachstum anderer Organismen effektiv gehemmt hat. Neben den Gewebeproben an Tag 1, besiedelten *Aeromonas* sp. auch alle Wassernullproben (siehe Anhang: „Balkendiagramme Wassernullproben“) zu Beginn der Experimente, sodass keine Differenzierung in extrinsische und intrinsische Bakterien erfolgen kann.

Neben dem ersten autolytischen Zerfall, wird die initiale Phase des Abbaus von Weichgewebe häufig von Spezies der *Aeromonaden* eingeleitet (Lobb *et al.*, 2020), was unter anderem durch die Produktion spezieller Hämolysine begünstigt wird. Diese Enzyme dienen der Lyse der Wirtszellen und ermöglichen mit weiteren Exoenzymen, wie Proteasen, Chitinasen oder Lipasen, die Nutzung eines großen Substratspektrums zur Energiegewinnung (Ellis, 1991; Gunnlaugsdóttir & Gudmundsdóttir, 1997; Hirvela-Koski *et al.*, 1994; Lobb *et al.*, 2020; Pemberton *et al.*, 1997; Sukhanova *et al.*, 2019). Allerdings kann die Aktivität bestimmter Enzyme, wie Chitinasen, zu einer Produktinhibierung führen. Sobald eine gewisse Menge an N-Acetylglucosamin durch den Abbau des Chitins angehäuft vorliegt, wird die Expression der Chitinasen verringert (Brzezinska & Donderski, 2001).

Die in diesem Projekt isolierten *Aeromonas* Spezies wiesen eine große Variabilität in den getesteten Enzymen auf (siehe Abbildung 27). *A. salmonicida* zeigte zwar eine starke Chitinase-

Aktivität, die zur Kohlenstoff-, Stickstoff- und Energiegewinnung eingesetzt werden kann, konnte jedoch keine Lipasen oder Proteasen synthetisieren. *A. hydrophila* dagegen war in der Lage, auf dem speziellen Testagar Proteasen auszubilden. Die bioinformatische Vorhersage über das Tool PICRUST2 ordnete die Aeromonaden der Versuchsreihen 4 (aerob, 4 °C, steriles Seewasser) und 8 (anaerob, 4 °C, steriles Seewasser) als Protease-negativ ein, was die Vermutung nahelegt, dass es sich hierbei wirklich um Mitglieder der Spezies *A. salmonicida* handeln könnte (siehe Abbildung 25). Im Gegensatz zu einer geringen Anzahl an Protease-bildenden Organismen in den Versuchsreihen 4 und 8, wurde eine große Menge an Lipase- und Chitinase-Produzenten vorhergesagt, was dem guten Erhalt des Gewebes widersprechen würde. Allerdings werden an dieser Stelle Einschränkungen des Vorhersage-Tools PICRUST2, insbesondere bei der Analyse von *Aeromonas* sp., sichtbar. Zum einen ist eine Differenzierung der Spezies in dieser Gattung extrem schwierig, da sie sich teilweise nur in einzelnen Basen in ihrer 16S-rRNA-Gensequenz unterscheiden (Menanteau-Ledouble *et al.*, 2016). Die Zuordnung der Vorhersagen mit PICRUST2 beruht auf den Sequenzen der ASVs, die lediglich 250 bp der 16S-rRNA-Genregion abdecken, weswegen keine fundierten Aussagen zu Spezies getroffen werden können. Außerdem existieren innerhalb einer Spezies eine Vielzahl an Typstämmen, die ganz unterschiedliche Exoenzyme synthetisieren, was eine detaillierte Interpretation erschwert. Da sich die Ergebnisse der bioinformatischen Vorhersage nur auf die vorhandenen Genanlagen bezieht, kann nicht analysiert werden, ob die Enzyme eine Aktivität ausprägen oder beispielsweise Produktinhibierung zu einer verringerten Expression geführt hat.

Neben der Produktion verschiedener Exoenzyme, die zum Abbau des Gewebes genutzt werden können, sind Aeromonaden auch in der Lage, die Präzipitation von Mineralien zu induzieren (Rivadeneira *et al.*, 1992). Sofern diese Aktivität überwiegt, würde dieses Phänomen eher zu einer Präservierung anstelle eines Zerfalls des Gewebes führen. Bei den isolierten Organismen zeigten bis auf *Aeromonas sobria* alle Spezies der Gattung *Aeromonas* ein positives Ergebnis auf dem speziellen Mineralisierungsagar. Kein Organismus innerhalb dieser Gattung konnte jedoch Enzyme zur hydrolytischen Spaltung von Urea zu synthetisieren.

Sobald die Menge an *Aeromonas* sp. innerhalb der Experimente abgenommen hatte, konnten sich für eine gewisse Zeitspanne Individuen der Gattung *Clostridium* durchsetzen. Oftmals dominieren Clostridien in Zerfallsexperimenten vor allem die finalen Phasen des Abbaus (Benbow *et al.*, 2015; Burcham *et al.*, 2019; Janaway *et al.*, 2009; Pechal *et al.*, 2014), wohingegen in unseren Versuchsreihen meistens die mittlere Zeitspanne besiedelt wurde. In den Versuchsreihen 1, 2, 5, 6, die bei 24 °C durchgeführt wurden, stieg die Menge an Clostridien ab Tag 3 stärker an mit einem

Höhepunkt um den Versuchstag 7. Der Abbau des Gewebes erfolgte verstärkt innerhalb der ersten Woche, sodass nach sieben Tagen die untersuchten Organe nicht mehr differenziert betrachtet werden konnten. *Clostridium* sp. zählen zu den obligat anaeroben Bakterien, weswegen sie sich erst nachdem sich ein anaerobes Milieu im Versuchsaufbau etabliert hat, stärker vermehren. Sie besiedeln vor allem Böden und Teile des Gastrointestinaltrakts vieler Organismen und sind in der Lage, spezielle Überdauerungsformen (Sporen) zu bilden (Carter *et al.*, 2017). Obwohl vermutet werden könnte, dass die Clostridien zu großen Teilen aus dem Sediment in den Versuchsaufbau eintreten (Haagsma, 1991), konnte diese Gattung im Sediment kaum nachgewiesen werden. Da *Clostridium* sp. auch in den sterilen Versuchen, aus denen extrinsische Bakterien ausgeschlossen werden sollten, teilweise dominierten (V2, V6), kann davon ausgegangen werden, dass das Genus *Clostridium* sp. hauptsächlich aus dem Darm der Flusskrebse oder aus dem anhaftenden Wasser stammte.

In anderen Studien konnten beim Abbau von Gewebe ebenfalls vermehrt Spezies der Gattung *Clostridium* detektiert werden (Benbow *et al.*, 2015; Lobb *et al.*, 2020; Metcalf *et al.*, 2016; Pechal *et al.*, 2014), die bekannt für die Produktion diverser, hydrolytischer Enzyme zum Abbau komplexer, extrazellulärer Substrate sind (Fourie *et al.*, 2020; Labbe & Huang, 1995; Matsushita & Okabe, 2001). In Wundinfektionen mit Clostridien (Gasbrand, *Clostridium perfringens*) gilt beispielsweise eine sezernierte Phospholipase als Haupttoxin, die zu sehr starkem Abbau des Weichgewebes führt (Flores-Díaz & Alape-Girón, 2003). Beim Zerfall von Embryos der Spezies *Helicidaris erythrogramma* in marinem Medium waren Clostridien unter anaeroben Bedingungen ebenfalls gemeinsam mit *Pseudoalteromonas* sp. und *Vibrio* sp. beteiligt (Raff *et al.*, 2008). Einige Spezies dieser Gattung können auch unter anaeroben Bedingungen langkettige Fettsäuren abbauen, was eine Bildung von Adipocire (Leichenwachs) verhindern kann (Hatamoto *et al.*, 2007).

Es konnten lediglich zwei *Clostridium* Spezies während der Versuchsreihen isoliert und auf ihre Eigenschaften getestet werden. Beide Spezies wuchsen ausschließlich unter anaeroben Bedingungen und zeigten in den in diesem Projekt durchgeführten Tests keine Ausbildung von Exoenzymen (*Clostridium amylolyticum*) beziehungsweise nur die Synthese einer Protease (*Clostridium bifermentans*; siehe Abbildung 27). Diese Beobachtung widerspricht der Literatur, da *C. bifermentans* sowohl als Lipase-, als auch Chitinase-Produzent beschrieben ist und mit Abszessen und Gasbrand assoziiert wird (Gorbach & Thadepalli, 1975; Meryandini, 2004; Sárvári & Schoblocher, 2020; Tso & Siebel, 1989). Allerdings war das Wachstum der *Clostridium* sp. im Anaerobentopf generell schwach, was sich auf die Eigenschaften ausgewirkt haben kann. In Versuchsreihe 7 (anaerob, 4 °C, unsteriles Seewasser) waren die Clostridien über den gesamten Verlauf des

Experimentes die dominierende Gattung. Lediglich am letzten Versuchstag nahm die Menge an *Clostridium* sp. ab, während *Acetobacteroides* sp. gleichzeitig leicht zugenommen haben (siehe Abbildung 20). Das Gewebe wurde in dieser Versuchsreihe trotz der kälteren Temperaturen stärker abgebaut, was vermutlich auf der effektiven Zerfallsaktivität der Clostridien beruht. Diese Beobachtung widerspricht der bioinformatischen Vorhersage, dass die vorgefundenen Organismen kaum Lipasen bilden können (siehe Abbildung 25). So war beispielsweise der Hepatopankreas, der von den Flusskrebse auch als Lipidspeicher genutzt wird (Vogt, 2019), in den meisten Individuen schon innerhalb der ersten 3 Wochen komplett abgebaut.

Der Abbau vom Regenbogen-Springbarsch *Etheostoma caeruleum* wurde ebenfalls in den frühen Phasen von *Aeromonas* sp. und *Clostridium* sp. dominiert (Lobb *et al.*, 2020). Anschließend konnte vergleichbar zu unseren Versuchsreihen eine Zunahme an Rikenellaceae, wie *Acetobacteroides* sp. verzeichnet werden (Lobb *et al.*, 2020). Diese Gattung beinhaltet nur die Spezies *Acetobacteroides hydrogenigenes* und wird in der Datenbank SILVA unter „Blvii28 wastewater-sludge group“ klassifiziert (Su *et al.*, 2014). Verschiedene Individuen dieser Gruppe wurden bereits im Zusammenhang mit dem effizienten Abbau von abgestorbenem Pflanzenmaterial beschrieben (Wu *et al.*, 2019). Da *Acetobacteroides* sp. obligat anaerob sind, können sich die Bakterien erst dann durchsetzen, nachdem sich ein anaerobes Milieu in den Versuchsreihen generiert hat. Der Organismus ist außerdem nicht in der Lage, organische Säuren, Alkohole oder Aminosäuren zu verstoffwechseln (Su *et al.*, 2014), weswegen die Zunahme erst nach der Aktivität vorangegangener Gattungen erfolgt. Es konnte beobachtet werden, dass die Gattung *Acetobacteroides* in allen Versuchsreihen erst mit dem Zerfall des Magens und des Hepatopankreas zugenommen hat. Ob im Magen oder Hepatopankreas eine Besiedelung mit *Acetobacteroides* sp. vorliegt, wurde bisher nicht untersucht. Spezies dieser Gattung wurden lediglich im Dünndarm der Süßwassergarnele *Macrobrachium nipponense* nachgewiesen (Sun *et al.*, 2020). Obwohl *A. hydrogenigenes* mesophil ist, also bei Temperaturen zwischen 20 °C und 40 °C am besten wachsen kann (Su *et al.*, 2014), nahm die Menge dieser Spezies auch in den Versuchsreihen 3 (aerob, 4 °C, unsteriles Seewasser) und 4 (aerob, 4 °C, steriles Seewasser) zu, allerdings in einem geringeren Ausmaß als bei höheren Temperaturen (24 °C). *Acetobacteroides* sp. fermentieren vor allem Zucker und produzieren dabei Acetat, H₂ und CO₂ (Ozbayram *et al.*, 2017; Su *et al.*, 2014), was dann im Anschluss anderen Organismen, wie methanogenen Archaea, als Substrat dienen kann. In der Versuchsreihe 3 (4 °C, aerob, unsteriles Wasser) stieg parallel zu *Acetobacteroides* sp., die Gattung *Bacteroides* ab Tag 21 an (siehe Abbildung 20). Beide Gattungen waren auch in den Vergleichsproben des Gewebes und des

Wassers an Tag 1 vorhanden, gehören also sowohl zur intrinsischen als auch zur extrinsischen Flora. Vermutlich erfüllen die *Bacteroides* sp. eine vergleichbare Funktion wie *Acetobacteroides* sp. Diese Gattung umfasst ebenfalls strikt anaerobe Organismen, die vor allem im Gastrointestinaltrakt vorzufinden sind. Aus diesem Grund dominieren *Bacteroides* sp. den Abbau von Säugertieren meistens in der Abdominalhöhle während der aktiven Aufblähphase (Hyde *et al.*, 2017; Metcalf *et al.*, 2016). Einige Spezies, z.B. *Bacteroides fragilis*, sind opportunistische Krankheitserreger und verfügen über eine große Anzahl an Exoenzymen mit denen sie Gewebe (Proteine, Lipide, Kohlenhydrate) effektiv zersetzen können (Ioan *et al.*, 2017; Wexler, 2007).

Ein weiteres Genus, das vor allem zu Beginn der Versuchsreihe 3 (aerob, 4 °C, unsteriles Seewasser; siehe Abbildung 20) nachgewiesen werden konnte und nur unter kalten Bedingungen vorhanden war (V4, V7), ist *Iodobacter*. Einige Spezies dieser Gattung sind psychrophil oder psychrotolerant, wie *Iodobacter limnosediminis* (Su *et al.*, 2013) oder *Iodobacter arcticus* (Srinivas *et al.*, 2013), und exprimieren auch bei 5 °C noch hydrolytisch aktive Enzyme (Lipase, Protease; Männistö & Häggblom, 2006). Dementsprechend kann vermutet werden, dass die Bakterien ein Teil der abbauenden Flora sind. Auffällig in Versuchsreihe 3 ist, dass weder *Aeromonas* sp., noch *Clostridium* sp. extrem dominierten, wie es in den anderen Versuchsreihen der Fall war. *Iodobacter* sp. produzieren das antimikrobielle Pigment Violacein, das das Wachstum vieler Gram-positiver und nur weniger Gram-negativer Organismen hemmt und von den Organismen als Quorum Sensing Signal genutzt wird (Durán *et al.*, 2007). Sowohl *Iodobacter* sp., als auch *Janthinobacterium* sp., welche auch für die Expression von Violacein bekannt sind, konnten im Zuge der 3. Versuchsreihe isoliert werden. Fast alle isolierten Organismen dieser Gattungen (*Janthinobacterium lividum*, *Iodobacter limnosediminis*) zeigten ein positives Ergebnis bezogen auf Chitinase- und Lipaseproduktion. *Iodobacter* sp. gehören zur Flora in verschiedenen Seen (Srinivas *et al.*, 2013), Fäzes (Lee *et al.*, 2019) oder Sediment (Su *et al.*, 2013) und konnten auch in Biofilmen (Sukhanova *et al.*, 2019) nachgewiesen werden. Da *Iodobacter* sp. sowohl in den Wassernullproben (V3, V5), als auch im Gewebe an Tag 1 (V3, V4) nachgewiesen werden konnte, kann nicht eindeutig zugeordnet werden, ob die Bakterien aus dem umgebenden Wasser oder Sediment oder aus der intrinsischen Flora stammten.

Während in den meisten Versuchsreihen am Ende der Experimente ein Anstieg an *Acetobacteroides* sp. auffällig war (V1, V3, V5, V6, V7), konnte sich diese Gattung in Versuchsreihe 2 (aerob, 24 °C, steriles Seewasser) nicht durchsetzen und die Genera *Ruminiclostridium* und *Sporobacter* (Ruminococcaceae NK4A214 group) dominierten am Ende den Versuchsaufbau (siehe

Abbildung 19). Diese Gram-positiven Gattungen spielten keine Rolle in den anderen Versuchsreihen und gehören zu den obligat anaeroben Bakterien der Klasse Clostridia, die genau wie *Clostridium* sp. Sporen ausbilden können (De Vos *et al.*, 2011; Wu & Cheng, 2015). Die Sporen, die auch für *Clostridium* sp. typisch sind, ermöglichen es den Bakterien zeitweise Nährstoffmangel zu überdauern und anschließend eine veränderte Nährstoffsituation zu erschließen (García *et al.*, 2020). *Ruminiclostridium* sp. und *Sporobacter* sp. sind typische Darmbakterien und an die limitierten Sauerstoffbedingungen, die am Ende des Experiments in den Reaktionsgefäßen vorlagen, angepasst (Fu *et al.*, 2018; Pacífico *et al.*, 2021; Shah *et al.*, 2021; Vazquez-Moreno *et al.*, 2021; Zuo *et al.*, 2019). Wie auch viele andere anaerobe Clostridia können *Ruminiclostridium* sp. Chitinasen produzieren und sind so in der Lage, Chitin und Chitin-Derivate effektiv zu verarbeiten. Vergleichbar zu unserem Versuchsaufbau, wurden *Ruminiclostridium* sp. in Mikrokosmos-Experimenten zur Analyse der Chitinase-Aktivität von Bodenbakterien vor allem in einer späteren Abbauphase detektiert. Es wurde vermutet, dass die Organismen die Produkte der aeroben Chitin-Hydrolyse effizient, komplett verstoffwechseln können (Wörner & Pester, 2019). Zusätzlich dazu exprimieren *Ruminiclostridium* sp. und *Sporobacter* sp. weitere hydrolytische Enzyme, wie Cellulasen und Proteasen (Qian *et al.*, 2019; Ravachol *et al.*, 2016; Wu & Cheng, 2015), und spielen eine große Rolle im Abbau von abgestorbenem Pflanzenmaterial. Aus diesem Grund besiedeln sie vermehrt den Pansen von Wiederkäuern oder den Darm von Termiten (Biscarini *et al.*, 2018; Hu *et al.*, 2018; Sheng *et al.*, 2016). Da beide Gattungen im Darm von Menschen und Tieren vorkommen und degradierende Exoenzyme synthetisieren, wurden sie auch mit dem Abbau von Weichgewebe in Verbindung gebracht (Liu *et al.*, 2021). In den Wassernullproben (siehe Anhang: „Balkendiagramme Wassernullproben“) nahm die Anzahl der Ruminiclostridien im Verlauf der Versuchsreihe 2 (aerob, 24 °C, steriles Seewasser) ebenfalls zu, sodass vermutet werden kann, dass die Organismen, wie auch bei Wörner & Pester (2019) aus dem Sediment oder aus dem Wasser stammten.

In Versuchsreihe 6 (anaerob, 24 °C, steriles Seewasser) konnten zu Beginn des Experiments die Genera *Bacillus* und *Candidatus Bacilloplasma* in größerer Menge detektiert werden (siehe Abbildung 19). *Candidatus Bacilloplasma* gehört, wie unter Abschnitt 4.1.2. detailliert beschrieben, zur Normalflora der Flusskrebse, weswegen eine frühe Besiedelung durch diesen Organismus nicht überraschend ist. Die Anzahl der *Candidatus Bacilloplasma* sp. nahm bis zum Tag 4 in der Versuchsreihe 6 zu und wurde anschließend komplett aus dem Versuchsaufbau verdrängt. Da dieser Organismus bisher noch nicht im Labor kultiviert werden konnte, existieren kaum Informationen über seinen Metabolismus. Als typisches Darmbakterium bei verschiedenen Arthropoden

(Chen *et al.*, 2015; Kostanjšek *et al.*, 2007; Shui *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2020), kann allerdings vermutet werden, dass die Gattung anaerobe Bedingungen tolerieren kann oder sogar zum Überleben braucht, und aus diesem Grund in der anaeroben Versuchsreihe 6 zu Beginn überleben kann. Die Anzahl der *Bacillus* sp. im Versuchsaufbau nahm bis zum Versuchstag 3 zu und fiel dann rapide auf 0 % ab. Obwohl lange Zeit angenommen wurde, dass Spezies dieser Gattung zu den strikt aeroben Organismen gezählt werden, konnten mittlerweile bis zu 20 Spezies isoliert werden, die fakultativ anaerob und zwei Spezies, die strikt anaerob wachsen (Logan & de Vos, 2015; Nakano & Zuber, 1998). Einige Individuen der Gattung *Bacillus*, wie *Bacillus subtilis*, *Bacillus anthracis* oder *Bacillus cereus*, sind in der Lage komplexe Kohlenhydrate und Proteine abzubauen und wurden sowohl mit dem Abbau von Weichgewebe (Chun *et al.*, 2015; Junkins *et al.*, 2017; Vass, 2001), als auch Pflanzenmaterial und Biofilmen (Sukhanova *et al.*, 2019) assoziiert. Anhand der isolierten Organismen dieser Gattung konnte diese Beobachtung unterstützt werden (siehe Abbildung 27), da bis auf *Bacillus idriensis* und *Bacillus bingmayongensis* alle Individuen eine Protease-Aktivität gezeigt haben. *Bacillus flexus* konnte zusätzlich eine Chitinase synthetisieren und Lipasen wurden ebenfalls von den meisten Bacilli produziert, was verdeutlicht, dass diese Gattung ein breites Substratspektrum zur Energiegewinnung nutzen kann. Neben der Fähigkeit effektiv Substanzen abzubauen, zeigen manche *Bacillus* Spezies aber auch das Potential durch Mineralisierung erhaltend zu wirken (Chunxiang *et al.*, 2009; Dhami *et al.*, 2013a). Besonders *B. megaterium* wurde detailliert in Hinblick auf eine biotechnologische Nutzung seiner Mineralisierungsfähigkeit erforscht. Durch die Expression einer effizienten Urease, kann das Bakterium die Bildung großer Mengen an Calciumcarbonat induzieren (Dhami *et al.*, 2013a, 2013b; Lian *et al.*, 2006). Im Mineralisierungstest zeigten bei den isolierten Spezies nur die psychrotoleranten *Bacillus* sp. kein positives Ergebnis.

Insgesamt blieb in allen Versuchsreihen eine komplette Mineralisierung des Weichgewebes aus, wohingegen in anderen Versuchen unter bestimmten Bedingungen beispielsweise eine Mineralisierung der Muskeln durch Calciumphosphat (Briggs & Kear, 1993c, 1994; Hof & Briggs, 1997; Sagemann *et al.*, 1999) und selten durch Calciumcarbonat (Mähler *et al.*, 2020) detektiert werden konnte. Da die Bildung der Mineralien auch von der Ionenkonzentration in der Umgebung abhängt, wird bestätigt, dass die minimalen Mengen an Phosphat in Frischwasser eine Präservierung der Muskeln in Calciumphosphat limitieren können (Briggs, 2003; Martin *et al.*, 2003). Allerdings sollte neben dem Wasser und dem Sediment (Briggs & Kear, 1993c), ebenfalls das Gewebe als Phosphatquelle dienen (Briggs & Kear, 1993c, 1994; Hof & Briggs, 1997). Obwohl kein

Weichgewebe mineralisiert werden konnte, wurde eine Ausfällung von Kalzit-Kristallen an der Innenseite des Panzers mithilfe einer Mikro-Computertomographie (engl. micro computed tomography; μ CT) dokumentiert (vgl. Mähler, 2021). Die Präzipitation konnte nur in den Versuchsreihen, die bei 24 °C durchgeführt wurden (V1, V2, V5, V6), beobachtet werden. Obwohl in anderen Versuchen die Sauerstoffbedingungen und die Diffusion des Sauerstoffs einen Einfluss auf die gebildeten Mineralien zu haben scheinen (Briggs & Kear, 1993c; Sagemann *et al.*, 1999), wurde in unseren Versuchsreihen, auch in den anaeroben Versuchsteilen bei denen die Diffusion eingeschränkt war (V5, V6), nur Kalzit nachgewiesen. Die Kalzit-Präzipitation war dabei deutlich stärker in den Versuchsreihen, die mit unsterilem Wasser durchgeführt wurden (V1, V5) als in den Experimenten mit sterilem Wasser (V2, V6, siehe Abbildung 33). Sagemann *et al.* (1999) konnten in Experimenten ohne extrinsisches Inokulum, was vergleichbar zu den sterilen Versuchsreihen ist, keine Mineralisierung des Weichgewebes bei der Garnele *Crangon crangon* nachweisen. Wie in Abbildung 33 aufgezeigt wird, nahm das Volumen der Kalzit-Kristalle unter anaeroben Bedingungen (V5, V6) leicht stärker zu als im Versuchsaufbau mit Sauerstoff (V1, V2). In Versuchsreihe 6 (anaerob, 24 °C, steriles Seewasser) verringerte sich die Kalzit-Menge ab Versuchstag 7 allerdings auch wieder, was Mähler *et al.* (2020) ebenfalls im Flusskrebs *C. diminutus*, der in destilliertem Wasser gelagert wurde, feststellen konnten. Es kann sein, dass durch die finalen Phasen des bakteriellen Abbaus der pH in einen sauren Bereich unter 7,0 gefallen war und daraufhin das Kalzit wieder gelöst wurde.

Ein großer Unterschied in der mikrobiellen Besiedelung der Proben war ein verstärktes Auftreten des Genus *Proteocatella* unter unsterilen Bedingungen (V1, V5) und könnte einen möglichen Erklärungsansatz für die größere Kalzit-Ausfällung darstellen. In den Versuchsreihen, die bei kalten Temperaturen und mit unsterilem Wasser inkubiert wurden (V3 V7), lag zwar *Proteocatella* sp. ebenfalls in einer größeren Menge vor, allerdings konnte hier keine Kalzit-Präzipitation nachgewiesen werden. Dieser Umstand kann jedoch teilweise anhand thermischer Bedingungen erklärt werden und wird in der Doktorarbeit von Mähler (2021) detailliert diskutiert.

Die Gattung *Proteocatella* besteht nur aus einer bisher bekannten Spezies, die ein breites Wachstumsspektrum aufweist und neben einer Toleranz gegenüber niedrigen Temperaturen, auch große pH Schwankungen überleben kann.

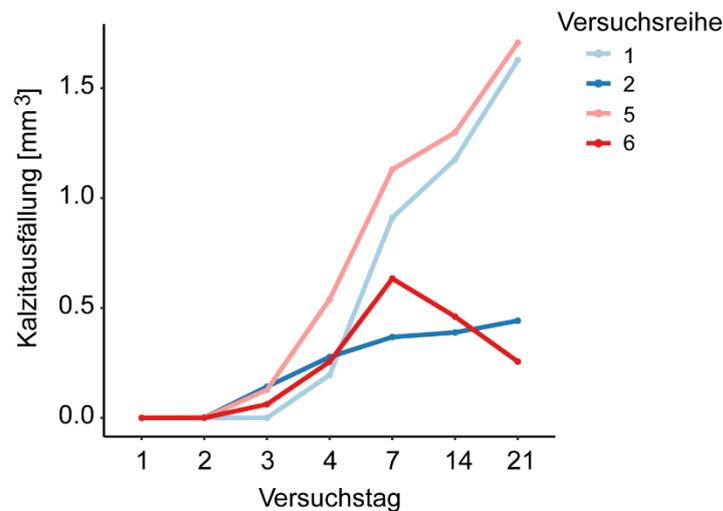


Abbildung 33: Bildung von Kalzit-Kristallen innerhalb der Flusskrebse bei 24 °C. Die Kristallbildung wurde in Triplikaten über die gesamte Versuchsdauer von 21 Tagen in regelmäßigen Abständen in einem μ CT untersucht. Dabei wurde sowohl die Menge, als auch die Größe der einzelnen Kristalle dokumentiert (Mähler, 2021). Versuchsreihe 1 = aerob, 24 °C, unsteriles Seewasser; Versuchsreihe 2 = aerob, 24 °C, steriles Seewasser; Versuchsreihe 5 = anaerob, 24 °C, unsteriles Seewasser; Versuchsreihe 6 = anaerob, 24 °C, steriles Seewasser

Proteocatella sphenisci wurde erstmals aus den Ausscheidungen von Magellan-Pinguinen (*Spheniscus magellanicus*) isoliert (Pikuta *et al.*, 2009) und konnte seither auch als Besiedler des Darmmikrobioms einer Schlammkrebbe (*Scylla paramamosain*) nachgewiesen werden (Lin *et al.*, 2020). Auf einem Schweinekadavar, der im Winter in einem Fluss gelagert wurde, dominierten *Proteocatella* sp. nach 28 Tagen gemeinsam mit Clostridien und Veillonellaceae (Benbow *et al.*, 2015). Die besondere Bedeutung dieses Organismus für die Kalzifizierung könnte sein, dass er als Teil des Mikrobioms einer karbonisierten Thrombolitstruktur (Graham *et al.*, 2014) und in der Plaque von Hunden und Katzen beschrieben wurde (Dewhirst *et al.*, 2015; Ruparell *et al.*, 2020). Aus diesem Grund kann vermutet werden, dass die Gattung *Proteocatella* eine Präzipitation von Kalzit im Gewebe der Flusskrebse positiv unterstützt oder sogar aktiv induziert hat. Andere Organismen, die lediglich in den Versuchsreihe 1 und 5 vorliegen, sind *Desulfovibrio* sp. und *Oscillibacter* sp. *Desulfovibrio* sp. gehört zu den Sulfat-reduzierenden Bakterien, die bekannt dafür sind, dass sie die Präzipitation verschiedener Mineralien induzieren (Braissant *et al.*, 2007; Van Lith *et al.*, 2003; Warthmann *et al.*, 2005). *Oscillibacter* sp. ist eine weniger erforschte Gattung und wurde, wie auch *Proteocatella* sp., als Bestandteil von Plaque beschrieben (Sands *et al.*, 2016). Beide Genera konnten allerdings nur in kleineren Mengen in den Versuchsreihen nachgewiesen werden.

4.1.4. Weitere abiotische Faktoren

Der Sauerstoffgehalt in der Umgebung kann Zerfalls- und Präservierungsprozesse beeinflussen, weshalb in unseren Versuchsreihen zwei Startbedingungen untersucht wurden. Unter aeroben Startbedingungen (V1-V4) wurde der Deckel der Versuchsgefäße nicht vollständig verschlossen, sodass ein geringer Sauerstoffeintrag möglich war. Allerdings wurde auch in diesen Versuchen der freie Sauerstoff durch die mikrobielle Aktivität innerhalb der ersten Tage verbraucht, was ebenfalls in anderen Experimenten beobachtet werden konnte (Briggs & Kear, 1993a; Hof & Briggs, 1997; Naimark *et al.*, 2016; Sagemann *et al.*, 1999). In den Versuchsreihen, die von Beginn an ohne Sauerstoff durchgeführt werden sollten (V5-V8), wurde β -Mercaptoethanol zugegeben. Das reduzierende Agens soll zu einer Spaltung der Disulfidbrücken der gewebeeigenen Enzyme führen, sodass keine autolytische Aktivität stattfindet und das Weichgewebe länger intakt bleibt. Während in unseren Versuchen kaum ein Unterschied beim Zerfall des Gewebes durch die Zugabe von β -Mercaptoethanol beobachtet werden konnte, zeigten andere Studien einen deutlich besseren Erhalt (Butler *et al.*, 2015; Egan *et al.*, 2017; Gostling *et al.*, 2008; Raff *et al.*, 2006, 2008; Raff *et al.*, 2014). Zusätzlich zum β -Mercaptoethanol wurde ein spezielles Gaserzeugungssystem (GasPak™ EZ Pouch System) zur Herstellung einer anaeroben Umgebung verwendet, allerdings konnten auch die anaeroben Bedingungen keine Verbesserung der Erhaltung erzielen. Obwohl Raff *et al.* (2008) sogar eine Inhibierung der autolytischen Enzyme alleine durch anaerobe Bedingungen zeigen konnten, sehen andere Studien die Zugabe der reduzierenden Substanzen als essentiell für eine effektive Hemmung der Autolyse an (Butler *et al.*, 2015; Hippler *et al.*, 2011). In den bisherigen Versuchen, in denen anaerobe Bedingungen oder reduzierende Reagenzien gegen die Autolyse der gewebeeigenen Enzyme eingesetzt wurden, waren die Organismen meistens deutlich kleiner, wie Embryos von *Helicoderma erythrogramma* (Durchmesser > 1 mm; Raff *et al.*, 2006, 2008; Raff *et al.*, 2014) oder *Artemia* sp. (Länge bis 12 mm, Butler *et al.*, 2015). Die verwendeten Flusskrebse *C. diminutus* dagegen können am Ende ihrer Häutungsstadien mit 25 mm fast die doppelte Größe erreichen. Es könnte also sein, dass die Menge an β -Mercaptoethanol (10 mM), die eingesetzt wurde, zu gering war, um die Autolyse der Studienorganismen effektiv zu hemmen. Die reduzierenden Bedingungen wirken nicht nur auf die Autolyse des Gewebes, sondern auch auf die mikrobielle Aktivität und vor allem die Biomineralisierung ein. In der Natur liegen die anaeroben und reduzierenden Bedingungen beim Abbau von Weichgewebe entweder durch äußere Umstände, wie beispielsweise dem Begraben des Gewebes durch Erdrutsche, vor oder werden durch die abbauenden Prozesse der Mikroorganismen mit der Zeit hergestellt (Briggs & Kear,

1993a, 1993c; Gostling *et al.*, 2009; Martin *et al.*, 2003; Sagemann *et al.*, 1999). Da die initialen Schritte des Szenarios, in dem das Gewebe durch einen Erdbeben oder Sedimentierung begraben wird, bisher jedoch nicht detailliert untersucht wurden, kann keine fundierte Aussage darüber getroffen werden wie schnell sich anoxische Bedingungen einstellen. Je nach Zusammensetzung, Partikelgröße und Herkunft des Sediments können die Sauerstoffbedingungen zu Beginn zusätzlich stark variieren (Canfield, 1994; Naimark *et al.*, 2018a).

Insgesamt war das Auftreten der häufigsten Genera in den Versuchsreihen vergleichbar zwischen den aeroben und anaeroben Versuchsreihen. Tang *et al.* (2006) führten den geringen Unterschied beim Abbau von Zooplankton unter aeroben oder anaeroben Bedingungen auf eine gute Adaptation der Umweltbakterien an veränderte Sauerstoffbedingungen zurück. Lediglich bei den Versuchsreihen 3 (aerob, 4 °C, unsteriles Seewasser) und 7 (anaerob, 4 °C, unsteriles Seewasser) waren zwar ähnliche Genera präsent, aber in unterschiedlich großem Ausmaß (siehe Abbildung 20). Der Zerfall des Gewebes verlief ebenfalls bei allen Versuchsreihen in einem ähnlichen zeitlichen Rahmen mit und ohne Sauerstoff. Bei Versuchsreihe 7 wurde das Gewebe unter anaeroben Bedingungen sogar schneller zersetzt. Verschiedene experimentelle Zerfallsstudien dokumentierten eine Verringerung der Abbaurate unter anaeroben Bedingungen (Briggs & Kear, 1993a, 1993b; Gostling *et al.*, 2009; Martin *et al.*, 2003), wohingegen andere Studien keinen (Allison, 1988; Kidwell & Baumiller, 1990) oder nur einen geringen Unterschied (Bartley, 1996; Briggs & Kear, 1994) im Zerfall des Weichgewebes nachweisen konnten. Hancy & Antcliffe (2020) konnten sogar einen stärkeren Abbau von speziellen Gewebsstrukturen der Seeanemone *Actinia equina* (Cnidaria) unter Sauerstoffabschluss verzeichnen. Diese Beobachtungen zeigen, dass neben der Sauerstoffverfügbarkeit viele weitere Parameter auf den Zerfallsprozess einwirken. Generell wird davon ausgegangen, dass der Abbau unter anaeroben Bedingungen verringert und das Zeitfenster für eine Präservierung verlängert wird, da die gewonnenen Energieäquivalente in den Stoffwechselwegen der (fakultativ) anaeroben Bakterien oftmals geringer sind als bei aeroben Stoffwechselwegen. Durch diesen Umstand wäre das Wachstum der meisten Organismen verringert, was allerdings nicht für alle Bakterien gilt. So zeigt das anaerobe Bakterium *Clostridium perfringens*, bekannt als Erzeuger des Gasbrandes in Wunden, eine sehr geringe Verdopplungszeit und produziert zahlreiche degradierende Exoenzyme, um infiziertes Gewebe effizient abzubauen zu können (Fourie *et al.*, 2020; Labbe & Huang, 1995).

Die Bakterien, die auf den Abbau oder die Präservierung des Weichgewebes einwirken, können sowohl Teil der intrinsischen (Gastrointestinaltrakt, Haut), als auch der extrinsischen Flora

(Wasser, Sediment, Pflanzen) sein. Diese Fragestellung sollte durch Zerfallsexperimente mit sterilem Wasser untersucht werden. Das Gewebe blieb oftmals (V2, V4, V8) in sterilem Wasser besser erhalten, da sich andere Bakterien durchsetzen konnten. Lediglich in Versuchsreihe 6 (anaerob, 24 °C, steriles Seewasser) war der Zerfall der Organe vergleichbar zu Versuchsreihe 5 (anaerob, 24 °C, unsteriles Seewasser), allerdings waren hier auch ähnliche bakterielle Gattungen, wie *Clostridium* oder *Acetobacteroides*, dominierend. Beim experimentellen Abbau einer Maus wurden die Organe ebenfalls hauptsächlich von intrinsischen Bakterien zersetzt (Burcham *et al.*, 2019). Generell wird vermutet, dass für die initialen Zerfallsprozesse vor allem endogene Organismen, die vornehmlich aus dem Darm der Tiere stammen, zuständig sind (Hilal *et al.*, 2021). Durch mikroskopische Beobachtungsstudien konnten Butler *et al.* (2015) die endogene Flora als den Hauptfaktor für einen guten Erhalt identifizieren. Die Bakterien, die vermutlich vor allem aus dem Gastrointestinaltrakt stammen und durch den Zerfall der Darmwand austreten, bauen zwar bestimmte Gewebsteile ab (Bickel & Tang, 2010), unterstützen durch die Ausbildung von Biofilmen aber ebenfalls eine authigene Mineralisierung der Organe (Butler *et al.*, 2015). Vor allem Bilateria, die sich durch das Vorhandensein des Gastrointestinaltraktes von ursprünglicheren Metazoa unterscheiden, machen einen Großteil der Fossilfunde aus, was die Autoren auf die präservierende Aktivität der endogenen Bakterien zurückführen. Eagan *et al.* (2017) dagegen nehmen an, dass dieser Umstand nicht für alle endogenen Bakterien gilt, da jedes Individuum von einer individuellen Flora besiedelt ist. Obwohl in unseren Versuchsreihen die Krebse zu Beginn der Versuche eine individuelle Flora aufgewiesen haben, zeigte die Verwendung der Triplikate eindeutig, dass der bakterielle Abbau unter den gleichen Bedingungen ähnlich verläuft und Tendenzen sichtbar werden.

Die mikrobielle Besiedelung der verschiedenen Körperbereiche der Flusskrebse unterschied sich, wie unter 4.1.2. bereits besprochen, teilweise. So zeigten Kiemen und Darm von *Cambarus sciotensis* eine individuelle Flora (Skelton *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2016), was Unterschiede in der Präservierung des Gewebes erklären könnte (Raff *et al.*, 2013). Während der Magen und der Hepatopankreas meistens sehr früh zerfallen waren, blieben in den Versuchsreihen 2, 3, 4, 7 und 8 die Kiemen länger erhalten. Andere Zerfallsexperimente konnten ebenfalls beobachten, dass Teile der Kiemen länger intakt geblieben sind, als andere Organe (Briggs & Kear, 1993b; Nanglu *et al.*, 2015). Diese Beobachtung beruht möglicherweise auf dem in die Kiemen eingelagerten Chitin, das als Nukleationspunkt für die Ausfällung von Mineralien dienen kann (Skawina, 2010). Neben der mikrobiellen Besiedelung scheint demnach auch das Weichgewebe selber das Ausmaß der Präservierung einzelner Organe beeinflussen zu können (Briggs & Kear, 1993b; Iniesto *et al.*, 2017). Die

Vernetzung der einzelnen Komponenten (Briggs, 1999, 2001; Riley, 1997) oder die Interaktion der Gewebsbestandteile mit speziellen Molekülen, wie beim Chitin (Stankiewicz *et al.*, 1998; Baas, 1995; Cody *et al.*, 2011), führen zu einer Stabilisierung der eigentlich labilen Strukturen und ermöglichen so eine bessere Erhaltung.

Der schnelle Zerfall des Hepatopankreas in den Versuchsreihen ist erstaunlich, da die Verdauungsdrüse in anderen Versuchen oftmals länger erhalten geblieben ist (Mähler, 2021) und sogar durch Calciumphosphat mineralisiert wurde (Briggs & Kear, 1993c, 1994; Hof & Briggs, 1997). Briggs & Kear (1993c) identifizierten die Mineralisierung des Hepatopankreas sogar als initialen Start für die Präservierung. Aus diesem Grund wurde vermutet, dass der Erhalt bestimmter Organe für den weiteren Verlauf des Abbaus und der Präservierung essentiell sein kann. Basierend auf dieser Vermutung, könnte es sein, dass der effiziente Abbau des Hepatopankreas in unseren Versuchsreihen den Zerfall des restlichen Weichgewebes begünstigt hat. Versuche mit *C. diminutus* in Frischwasser konnten bei einigen Individuen eine starke Biofilmbildung zeigen (Mähler, 2021). Sofern ein Biofilm innerhalb der ersten Tage nach dem Tod des Tieres gebildet werden konnte, blieb die Verdauungsdrüse immer in Form von Adipocire (Leichenwachs) erhalten. Einen großen Unterschied in der mikrobiellen Besiedelung des Biofilms von Mähler (2021) und unseren Versuchsreihen bildet die Gattung *Aeromonas*. Während diese Organismen in unseren Versuchsreihen ubiquitär in großer Menge vorhanden waren, besiedelten sie nur in geringer Anzahl den Biofilm. Es könnte sein, dass die Gattung die Zersetzung des Hepatopankreas unterstützt hat, da sie in der Lage ist, sowohl Lipasen auszubilden, als auch niedrige pH-Werte und Säuren zu tolerieren, die der Hepatopankreas abgibt (Sautour *et al.*, 2003).

Ein positiver Einfluss eines Biofilms auf die Präservierung von Gewebe konnte bereits mehrfach für tierisches (z.B. Butler *et al.*, 2015; Darroch *et al.*, 2012; Iniesto *et al.*, 2013, 2015a, 2015b, 2016, 2017; Martin *et al.*, 2005; Peterson *et al.*, 2010; Raff *et al.*, 2008, 2013; Raff *et al.*, 2014) oder pflanzliches Material (Dunn *et al.*, 1997; Iniesto *et al.*, 2018) nachgewiesen werden. Obwohl nach der bioinformatischen Analyse in allen Versuchsreihen zu Beginn der Experimente eine große Anzahl an biofilmbildenden Bakterien vorliegen sollte (siehe Abbildung 24) und die hauptsächlich vorkommenden Gram-negativen Bakterien (siehe Abbildung 22) generell effizienter in der Bildung der schützenden, exopolymeren Substanz sind (Costerton *et al.*, 1981; Dunne, 2002), konnte in keinem Versuchsaufbau die Ausbildung eines solchen nachgewiesen werden. Während in allen Versuchsreihen die Anzahl der biofilmbildenden Bakterien nach den ersten Versuchstagen deutlich abgenommen hat, zeigten die Versuchsreihen 4 (aerob, 4 °C, steriles Seewasser) und 8

(anaerob, 4 °C, steriles Seewasser) eine gleichbleibend hohe Menge. Dieser Umstand kann anhand der *Aeromonas* sp. erklärt werden, die die beiden Versuchsreihen extrem dominiert haben. Einige Spezies dieser Gattung sind für eine starke Synthese exopolymerer Substanzen bekannt (Talagrand-Reboul *et al.*, 2017). Die meisten der isolierten *Aeromonas* Spezies konnten im Biofilm-Test unter aeroben Bedingungen eine schwache bis starke Biofilmbildung zeigen. Allerdings wird im natürlichen Umfeld ein Biofilm selten nur von einer bakteriellen Spezies alleine gebildet, meistens handelt es sich eher um einen Zusammenschluss unterschiedlichster Arten, die gegenseitig voneinander profitieren und dadurch den Biofilm und die vorliegenden Nährstoffe gemeinsam als Lebensraum nutzen können (Jagmann *et al.*, 2012; O'Toole *et al.*, 2000; Sutherland, 2001b). Manche Organismen können sich dabei gegenseitig unterstützen, andere inhibieren die Ausbildung einer Glykokalyx dagegen (Cheng *et al.*, 2014; Guerrieri *et al.*, 2008). Solche Interaktionen zwischen Organismen können anhand bioinformatischer Analysen nicht vorhergesagt werden und werden von unterschiedlichen äußeren Einflüssen, wie dem Nahrungs- oder Platzangebot, gesteuert. Neben den biotischen Einflüssen, können natürlich auch abiotische Faktoren, wie der Sauerstoffgehalt oder die Temperatur auf die Biofilmbildung einwirken (Raff *et al.*, 2008). Organismen, die unter aeroben Bedingungen eine dicke Glykokalyx ausbilden können, zeigen unter anaeroben Bedingungen eventuell kaum Biofilmbildung (Stepanović *et al.*, 2003). Bei der Gattung *Aeromonas*, die viele der Versuchsaufbauten zu Beginn der Experimente dominierte, existieren nur sehr wenige Studien über die Biofilmbildung unter anaeroben Bedingungen (Castro *et al.*, 2014). Auch die Synthese einer Glykokalyx durch *Clostridium* sp. oder *Acetobacteroides* sp. wurde bisher kaum oder gar nicht untersucht. *Acetobacteroides* sp. (bzw. Blvii28) konnten zwar als Teil eines Biofilms in einem Bioreaktor oder in Filter-Membransystemen detektiert werden, die Rolle, die die Gattung hierbei erfüllt, ist jedoch weiterhin unbekannt (Barathi *et al.*, 2021; Silva *et al.*, 2018). Außerdem sind *Acetobacteroides* sp. zu einem Zeitpunkt in den Zerfallsprozess eingestiegen, in dem das Gewebe schon so sehr zersetzt war, dass eine Präservierung durch einen Biofilm kaum noch möglich war. Obwohl verschiedene *Clostridium* sp. in der Lage sind, gravierende Infektionen auszulösen, existieren nur wenige Studien über Mono-Spezies Biofilme dieser Gattung. Auffällig ist, dass sowohl *Clostridium difficile*, als auch *Clostridium perfringens* bei 37 °C Biofilme ausbilden können, bei 25 °C jedoch nur Biofilm-ähnliche aber nicht adhärente Substanzen synthetisieren (Pantaléon *et al.*, 2014). Die Temperatur beeinflusst ebenfalls die Biofilmbildung der Aeromonaden, bei 4 °C konnte *A. hydrophila* kaum noch exopolymere Substanz bilden, bei 25 °C dagegen war die Ausbildung maximal (Mizan *et al.*, 2018). Unter diesen Aspekten hätte in Versuchsreihe 2 (aerob, 24 °C,

steriles Seewasser) ein Biofilm ausgebildet werden müssen, da hier 25 °C und eine große Menge an *Aeromonas* sp. über den gesamten Versuchsverlauf vorlagen. Ein weiterer Aspekt, der die Bildung einer Glykokalyx in den Versuchsreihen beeinflusst haben kann, ist die Motilität der Bakterien. Beweglichkeit, durch das Vorhandensein von Flagellen oder Pili, kann die Anheftung an das Substrat beeinflussen, da dies den ersten Schritt der Biofilmbildung darstellt (Dapa *et al.*, 2013). Ein paar der Organismen, die in den Versuchsreihen nachgewiesen wurden, sind unbeweglich, wodurch eine aktive Anheftung und initiale Biofilmbildung dieser Bakterien verhindert werden könnte. Sie könnten lediglich einen vorhandenen Biofilm nutzen. Hierzu gehören sowohl *Acetobacteroides* sp., als auch *Aeromonas salmonicida*. Da *A. salmonicida* psychrotolerant sind, kann vermutet werden, dass diese Spezies den Versuchsaufbau bei 4 °C dominiert hat und deshalb eine initiale Biofilmbildung ausgeblieben ist.

Insgesamt ist es verwunderlich, dass in nachfolgenden Zerfallsexperimenten, die von Mähler (2021) in großen Aquarien durchgeführt wurden, in den meisten Fällen ein Biofilm rund um Kadaver von *C. diminutus* gebildet wurde. Unterschiede zwischen diesen Versuchen und den in diesem Projekt durchgeführten Versuchsreihen sind das verwendete Wasser (Aquarienwasser, Seewasser), das Substrat (Quarzsand, natürliches Sediment) und ein deutlich größerer Versuchsaufbau, da ein Kadaver in ein 60 l Aquarium gelegt wurde. Außerdem wurde neben einige der Studienorganismen ein Futterring gelegt, der als zusätzliche Nahrungsquelle für die Bakterien dienen sollte. Sagemann *et al.* (1999) konnten ebenfalls nachweisen, dass die Zugabe von Glucose zu einem Zerfallsexperiment in einer Ummantelung des Kadavers mit exopolymerer Substanz resultierte und dadurch sowohl das Gewebe besser erhalten blieb, als auch große Kalzit-Strukturen auf dieser Glykokalyx präzipitiert sind. Der Umstand, dass eine starke Biofilmbildung nur in einem von zwei Aquarien nachgewiesen werden konnte, obwohl die Bedingungen gleich gehalten wurden, unterstreicht die Komplexität des gesamten Abbau- und Präservierungsprozesses. Die Größe des Gefäßes und das Material (Polypropylen) kann kaum eine Rolle gespielt haben, da die isolierten Bakterien auch in 96-Well-Platten oder Falcon-Tubes in Biofilmtests die Ausbildung einer Glykokalyx gezeigt haben (Stepanović *et al.*, 2000). Außerdem wurden in ähnlichen Zerfallsexperimenten Volumina zwischen 5 - 10 ml verwendet und auch hier war eine Biofilmbildung sichtbar (Butler *et al.*, 2015; Martin *et al.*, 2005; Raff *et al.*, 2013).

Das unterschiedliche Wasser, das für die Experimente verwendet wurde, scheint nach ersten Erkenntnissen ebenfalls nicht der Grund für das Ausbleiben eines Biofilms in den Versuchsreihen zu sein. In den Vorversuchen, die in Aquarien- und Seewasser, durchgeführt wurden, konnte in

keinem Versuchsaufbau ein Biofilm detektiert werden und auch bei Mähler *et al.* (2020) blieb die Synthese einer Glykokalyx in den Ansätzen mit Aquarienwasser aus. Allerdings ist das Mikrobiom in Aquarien und - vor allem - in Seen eine dynamische Gemeinschaft, die durch die umgebende Flora und Fauna beeinflusst wird, sodass ein Vergleich von Wasserproben, die zu unterschiedlichen Zeiten genommen wurden, schwierig ist. Eine Analyse der 16S-rRNA- sowie der ITS-Gensequenz, die zur Identifikation von Fungi verwendet wird, zeigte dass die Biofilme, die von Mähler (2021) auf den Flusskrebse gefunden wurden, zu großen Teilen aus dem Dachpilz *Pluteus* sp. und verschiedenen Bakterien zusammengesetzt sind. Neben *Clostridium* sp., die auch in den Versuchsreihen in großer Zahl vorgefunden wurden, dominierten im Biofilm vor allem die Genera *Sphaerotilus*, *Azospirillum*, *Dechloromonas*, *Hydrogenophaga* und *Novispirillum*. *Sphaerotilus* sp. und *Hydrogenophaga* sp. konnten zu Beginn mehrerer Versuchsreihen nachgewiesen werden, ihr Anteil nahm jedoch von Tag zu Tag ab. Die Gattung *Azospirillum* konnte in diesem Projekt lediglich in Versuchsreihe 2 (aerob, 24 °C, steriles Seewasser) vorgefunden werden. Bei den isolierten Organismen konnte die Spezies *Hydrogenophaga laconesensis* eine moderate, *Azospirillum palustre* eine schwache Biofilmbildung zeigen (siehe Abbildung 27). Scheinbar konnten sich diese für die Biofilmbildung wichtigen Gruppen im Versuchsaufbau nicht gegen die schnellwachsenden *Aeromonas* sp. durchsetzen. Diese Gattung, die in allen Versuchsaufbauten in großer Menge detektiert wurde, war in den Biofilmen nur in einem Replikat stärker vertreten.

Ein weiterer Unterschied zwischen dem Versuchsaufbau von Mähler (2021) und unseren Versuchsreihen, stellt das verwendete Substrat dar. Die Zusammensetzung des Sediments ist vermutlich vor allem für die Präzipitation authigener Mineralien wichtig (Newman *et al.*, 2019; Sansom, 2014). Außerdem können Veränderungen in den biochemischen Bedingungen der Umgebung, hervorgerufen durch die veränderte mikrobielle Aktivität, Ionen aus dem Sediment herauslösen, die dann wiederum die Mikroorganismen inhibieren und das Gewebe stabilisieren können (Wilson & Butterfield, 2014; Naimark *et al.*, 2016a, 2016b, 2017, 2018a, 2018b; McMahon *et al.*, 2016; Morrison *et al.*, 2016; Williams *et al.*, 2011; Newman *et al.*, 2019). Bei den Versuchsreihen wurde Sediment aus dem natürlichen Habitat der Tongrube in Röttgen verwendet, in den Aquarienversuchen rot-schwarzer Quarzkies eingesetzt. Mineralogisch besteht der Quarzkies aus SiO₂, was auch bei dem natürlichen Sediment den Hauptbestandteil ausmacht (> 96,8 %, vgl. Mähler, 2021). Der Quarzkies bringt allerdings eine andere mikrobielle Besiedelung ein, als das Sediment. Die Organismen, die das Sediment zu Beginn der Versuchsreihen hauptsächlich besiedeln (siehe Abbildung 15), scheinen sich jedoch nicht durchsetzen zu können und hatten dementsprechend

vermutlich kaum Einfluss auf den Zerfall. Die Rolle des Sediments für die Zerfalls- und Präservierungsprozesse wurde in Zerfallsexperimenten unterschiedlich interpretiert. Während Naimark *et al.* (2016a, 2016b, 2017, 2018a, 2018b) und Newman *et al.* (2019) eine deutlich verbesserte Präservierung und Mineralisierung durch die Verwendung von Sediment zeigen konnten, war in anderen Versuchen kaum ein bzw. kein Unterschied nachweisbar (Briggs & Kear, 1994; Mähler *et al.*, 2020; Sagemann *et al.*, 1999). In den Versuchsreihen konnte keine Verbesserung in der Präservierung dokumentiert werden, wenn das Sediment unbehandelt verwendet wurde. Außerdem konnte kein Zusammenhang zwischen der Menge an gelöstem Calcium aus dem Sediment und der Menge an Kalzit-Ausfällungen in den Versuchstieren nachgewiesen werden (vgl. Mähler, 2021).

4.2. Isolation der Organismen

Während der Versuchsreihen wurden verschiedene Organismen auf unterschiedlichsten Nährmedien angezogen, typisiert und anschließend auf ihre Eigenschaften getestet. Die Fähigkeit Calciumcarbonat-Strukturen zu präzipitieren wurde auf speziellen Nährmedien überprüft. Dabei wurden unterschiedlichste Kristallstrukturen nachgewiesen. Diese Beobachtung kann durch die spezifischen Eigenschaften der bakteriellen Oberflächen erklärt werden, was dazu führt, dass besonders die Morphologie von Zell-assoziierten Mineralien zwischen unterschiedlichen Gattungen stark variieren kann (Seifan *et al.*, 2016). Neben der Form der Calciumcarbonat-Strukturen sind auch die Mengen oder die Kristallstruktur (Kalzit, Aragonit, Dolomit) oftmals abhängig von der Spezies (Ferrer *et al.*, 1988; Hammes *et al.*, 2003). Die Präzipitation von Mineralien konnte auf den Agar-Platten sowohl auf den Kolonien, als auch in der Umgebung gezeigt werden. Vor allem am direkten Rand der einzelnen Kolonien oder zwischen zwei Kolonien konnten verstärkt Kristallstrukturen detektiert werden (siehe Abbildung 31). Vermutlich lag in diesem Bereich durch die mikrobielle Aktivität ein lokal, veränderter pH vor, der die Ausfällung von Calciumcarbonat begünstigt hat. Das Nährmedium war mit Calciumacetat angereichert und hatte einen pH von 8,0, was einen Stressfaktor für die Bakterien darstellt. Durch passiven Calcium-Einstrom baut sich im Inneren der Bakterienzelle eine hohe Konzentration an Calcium auf. Um zu überleben wird das Calcium aktiv aus der Zelle heraus- und Protonen hineingepumpt, was in einem pH-Anstieg resultiert. Gemeinsam mit den lokal sehr hohen Konzentrationen an Calcium führt dies zu idealen Bedingungen für eine Präzipitation von Calciumcarbonat in der Nähe der bakteriellen Zellwand (Hammes & Verstraete, 2002).

Neben der Fähigkeit die Präzipitation von Mineralien zu induzieren, wurde das Fehlen von degradierenden Exoenzymen und die Ausbildung einer Glykokalyx als förderlich für eine Fossilisation eingestuft. Diese Eigenschaften zeigten insgesamt fünf verschiedene Organismen (siehe Abbildung 27; *Delftia acidovorans*, *Yersinia intermedia*, *Pseudomonas vancouverensis*, *Aeromonas media* 2, *Microvirgula denitrificans*) in unterschiedlicher Ausprägung, die zum Teil eine breite Toleranz gegen abiotische Stressfaktoren aufweisen (z.B. Beblo-Vranesevic *et al.*, 2017; Funari *et al.*, 2019; Gaboyer *et al.*, 2017). Alle Spezies konnten eher in der Mitte oder am Ende der Versuchsreihen isoliert werden (ab Tag 7). Obwohl keines der Bakterien zu den dominanten Genera zugeordnet werden konnte, waren sie trotzdem auf den Organismen vorhanden und könnten einen Einfluss auf den Verlauf des Zerfallsprozesses gehabt haben. *Delftia acidovorans*, ehemals *Comamonas/Pseudomonas acidovorans*, ist besonders bekannt, weil es eingelagert in einen Biofilm in der Lage ist, Nanopartikel aus Gold, als Detoxifikations-Mechanismus gegen große Mengen an freien Gold-Ionen, zu bilden (Funari *et al.*, 2019). Die Gattung *Yersinia* beinhaltet fakultativ anaerobe Organismen, die zwar keine Sporen bilden können, aber trotzdem in der Lage sind, extreme Umweltbedingungen zu tolerieren und zu überleben (Beblo-Vranesevic *et al.*, 2017). Ein polyextremotoleranter Typstamm der Spezies *Y. intermedia* zeigte die Bildung von Silikat und Gips unter Stressbedingungen, die so ähnlich vermutlich auf dem Mars vorgefunden werden können (Gaboyer *et al.*, 2017). Außerdem konnte *Y. intermedia* aus einem Teil des Bauchfells (Omentum) eines im Permafrost erhaltenen Kalbs isoliert werden, wobei eine moderne Kontamination mit diesem Stamm nicht eindeutig ausgeschlossen werden konnte (Ferrari *et al.*, 2018). Wie die meisten Organismen der Gattung *Pseudomonas* bildet *P. vancouverensis* einen starken Biofilm aus und könnte damit eine der Grundvoraussetzungen für einen guten Erhalt schaffen. Generell lässt die Analyse der Charakteristika der einzelnen Bakterien außen vor, dass Mikroorganismen immer in einer Gemeinschaft leben und ihr Verhalten an die vorliegenden Bedingungen und die Interaktionen mit den umliegenden Spezies anpassen. Ist ein Organismus beispielsweise nicht in der Lage selber Exopolymerstrukturen auszubilden, siedelt sich aber in einem bestehenden Biofilm an und induziert eine starke Mineralisierung, kann er ebenfalls ein Hauptakteur im Fossilisationsprozess sein. Aus diesem Grund sind auch Organismen interessant, die nur eine oder zwei der gewünschten drei Eigenschaften ausprägen. Generell können experimentelle Untersuchungen unter kontrollierten Bedingungen zu offenen Fragestellungen, wie der Entstehung von Fossilien, zwar helfen bestimmte Prozesse zu verstehen, sie sind jedoch nicht in der Lage, alle natürlichen Vorgänge mit den spezifischen Interaktionen widerzuspiegeln.

4.3. Schwierigkeiten mit der Methodik

Die Analyse der 16S-rRNA-Amplikons ermöglicht die Interpretation der bakteriellen Gemeinschaft und Veränderungen in ihrer Zusammensetzung über die Zeit eines Experimentes. Durch sinkende Kosten und schnelle Hochdurchsatz-Sequenzierungen erfreut sich diese Methode immer größerer Beliebtheit und wird auf verschiedene Fragestellungen in unterschiedlichsten Fachbereichen angewandt (Caporaso *et al.*, 2012). Allerdings kann nur das interpretiert und analysiert werden, was bei der Probenvorbereitung, dem Sequenziervorgang oder der bioinformatischen Analyse nicht verloren gegangen ist. Schon das Sammeln und Lagern der Proben kann sich auf die bakterielle Zusammensetzung auswirken (Pollock *et al.*, 2018). Unterschiedliche Methoden zur Aufreinigung der mikrobiellen DNA aus komplexen Proben können bestimmte bakterielle Gruppen diskriminieren und die Diversität der bakteriellen Gemeinschaft dadurch beeinflussen (siehe Abschnitt 4.1.1.). Studien zum Mikrobiom der Decapoda, zu denen auch der Studienorganismus *Cambarellus diminutus* gezählt wird, existieren kaum für den Einsatz des gesamten Gewebes und konzentrieren sich meistens auf einzelne Körperregionen, wie den Gastrointestinaltrakt, die Kiemen oder die Muskeln (Cheung *et al.*, 2015; Marrone *et al.*, 2020; Skelton *et al.*, 2017; siehe Abschnitt 4.1.2.). Aus diesem Grund war ein Vergleich der Protokolle nicht sinnvoll. Eine Überprüfung des Aufreinigungs-Protokolls mit einer bekannten Mock-Gemeinschaft (siehe 4.1.1.) kann zwar erste Erkenntnisse liefern, allerdings werden seltene oder bisher unkultivierte Organismen und ihr Lyseverhalten dabei nicht betrachtet. Deshalb sollten alle Ergebnisse mit Vorsicht betrachtet werden und eine mögliche Verzerrung der bakteriellen Gemeinschaft in Betracht gezogen werden. Genauso wie die DNA-Extraktion, kann auch die Wahl der Primer bestimmte Organismen von der Analyse ausschließen und dadurch Fehlerquellen in die Interpretation einführen (Albertsen *et al.*, 2015; Brandt & Albertsen, 2018; Fouhy *et al.*, 2016). In diesem Projekt wurden Primer für die V4-Region des 16S-rRNA-Gens verwendet, da andere Primer beispielsweise Phyla der Archeae ausschließen können. Obwohl auch mit dieser variablen Region nicht alle Phyla korrekt abgebildet werden können, ermöglicht die Verwendung der V4-Primer eine vergleichsweise gute Darstellung der Diversität der Proben (Brandt & Albertsen, 2018).

Eine weitere Fehlerquelle stellt die Wahl der Datenbank dar. Die Ergebnisse der Sequenzierungen werden verglichen und anhand bestimmter Schwellenwerte zu ASVs zusammengefasst. Diese Varianten werden dann mit bekannten Datenbanken abgeglichen und taxonomisch zugeordnet. Bekannte Datenbanken sind SILVA (Pruesse *et al.*, 2007), Greengenes (DeSantis *et al.*, 2006)

oder NCBI BLAST® (www.ncbi.nlm.nih.gov, Stand: 04.2021). Unsere eigenen Ergebnisse konnten zeigen, dass die Verwendung unterschiedlicher Datenbanken in verschiedene taxonomische Zuordnungen resultierte (siehe Abbildung 34).

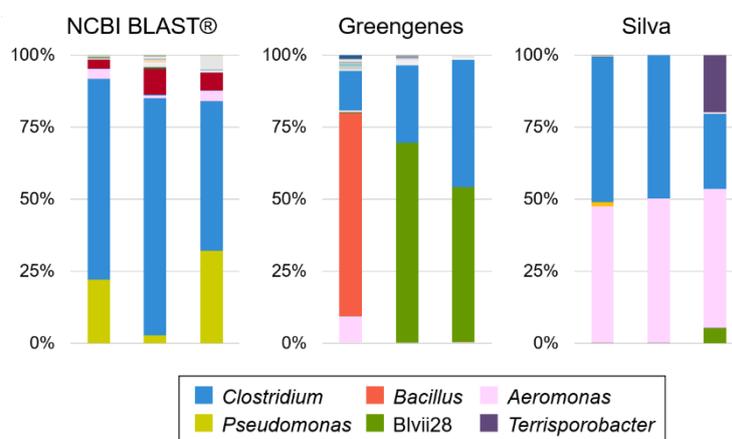


Abbildung 34: Vergleich der Datenbanken für die taxonomische Zuordnung der ASVs. Während die Sequenzierfirma ihre ASVs über eine auf NCBI BLAST® basierende Datenbank prozessiert hat, wurde in diesem Projekt Silva verwendet. In der Übersicht wird klar, dass durch die Verwendung unterschiedlicher Datenbanken ein Bias in die Interpretation der Ergebnisse eingeführt werden kann.

Während die Datenbank, die von der zuständigen Sequenzierfirma verwendet wurde (NCBI BLAST®), bestimmte Sequenzen mit der Gattung *Pseudomonas* in Verbindung gebracht hat, konnte mit SILVA der gleiche Anteil dagegen *Aeromonas* sp. zugeordnet werden. Da diese Gattung in den Versuchsreihen eine große Rolle gespielt hat, kann eine falsche Zuordnung die gesamte Interpretation verändern. Der Umstand, dass bei der Analyse der Mock-Gemeinschaft das Genus *Pseudomonas* korrekt mit der Datenbank SILVA dargestellt werden konnte, zeigt, dass die Differenzierung der Organismen durch diese Datenbank vermutlich genauer ist. Greengenes wurde das letzte Mal im Jahr 2013 mit den neuesten Daten verbessert, sodass viele neu entdeckte Genera in dieser Datenbank noch nicht vorhanden sind (Almeida *et al.*, 2018).

Die taxonomische Zuordnung anhand der ASVs, die lediglich bis zu 250 bp lang sind, kann nicht akkurat bis auf die Spezies-Ebene durchgeführt werden (Johnson *et al.*, 2019; Winand *et al.*, 2020). Um einzelne Spezies und ihre spezifischen Eigenschaften bestimmen zu können, was in der Planung dieses Projektes überlegt wurde, müssten die gesamten 16S-rRNA-Gensequenzen analysiert werden. Die Vielfältigkeit innerhalb der metabolischen Eigenschaften verschiedener Genera und der individuellen Anpassungen an abiotische und biotische Faktoren erschwert eine genaue Deutung der Aufgaben, die die einzelnen Bakterien innerhalb der mikrobiellen Gemeinschaft erfüllen. Diese Problematik sollte mit der bioinformatischen Vorhersage über die Tools BugBase und

PICRUSt2 gelöst werden (Douglas *et al.*, 2020; Ward *et al.*, 2017). Allerdings gibt es auch bei der Verwendung dieser Tools Einschränkungen, die eine genaue Analyse verhindern. In den durchgeführten Versuchsreihen wird offensichtlich, dass die vorgefundenen ASVs zwar zu Vergleichsgenomen zugeordnet werden können, die scheinbar grundsätzlich die Fähigkeit einen Biofilm zu bilden aufweisen (siehe Abbildung 24), jedoch konnte kein Biofilm nachgewiesen werden. Die vielfältigen Anpassungen und komplexen Regulationsmechanismen (z.B. Barbieri *et al.*, 2016; McAdams *et al.*, 2004; Raff *et al.*, 2014) der Bakterien werden in der bioinformatischen Zuordnung nicht mit einbezogen. Außerdem kann die 16S-rRNA-Sequenz nicht die ganzen Variationen zwischen Spezies oder sogar Typstämmen abbilden. Bei der Software PICRUSt2 wird eine andere Limitation offensichtlich. Die ASVs werden in einen phylogenetischen Baum eingebaut, mit Vergleichsgenomen abgeglichen und daraufhin eine Voraussage über die metabolischen Eigenschaften getroffen. Liegt kein Vergleichsgenom vor, werden die Genome nah verwandter Organismen einbezogen. In stark untersuchten Forschungsgebieten, wie dem menschlichen Mikrobiom oder dem Bodenmikrobiom, sind in den Datenbanken viele Vergleichsgenome hinterlegt. Umso genauer kann die Zuordnung erfolgen und umso eindeutiger ist auch die Verwandtschaft zwischen phylogenetischen Gruppen. In unserem Fall lagen viele unkultivierte und seltene Organismen vor, sodass die bioinformatische Zuordnung vermutlich nicht eindeutig durchgeführt werden konnte. All diese Beschränkungen wurden in der Interpretation der Daten offensichtlich. In zukünftigen Projekten müsste das Metatranskriptom der Proben analysiert werden, um genaue Aussagen über die metabolische Aktivität der Organismen treffen zu können (vgl. McCarren *et al.*, 2010). Diese Analysen sind allerdings deutlich teurer, wodurch weniger Versuchsreihen oder -tage geplant werden könnten.

Während der Versuchsreihen wurde ein weiteres Problem deutlich. Bevor die DNA sequenziert werden kann, muss sie über eine PCR und die spezifischen 16S-Primer vervielfältigt werden. Hierbei unterscheidet die Methode nicht zwischen der DNA von lebenden oder toten Organismen, was die mikrobielle Zusammensetzung verschieben kann. Obwohl DNA ein relativ labiles Makromolekül ist, kann sie über längere Zeit nach dem Zelltod erhalten bleiben (Allentoft *et al.*, 2012; Lindahl, 1993). In manchen Studien wird eine Vorbehandlung der Zellen mit Propidiummonoazid (PMA) durchgeführt, das die Zellwände toter Zellen durchdringen kann. Der photoreaktive Farbstoff wird durch Behandlung mit UV-Licht zu einem reaktiven Intermediat und bindet kovalent an die DNA, die dann im nächsten Schritt nicht von der Polymerase vervielfältigt werden kann (Nocker *et al.*, 2006). PMA wurde bereits mit einzelnen Bakterienstämmen (Nocker *et al.*, 2007),

aber auch Proben unterschiedlichen Ursprungs, wie z.B. Fäzes oder Permafrost-Boden (Burkert *et al.*, 2019; Fu *et al.*, 2018), getestet. Insgesamt kamen die Studien zu keinem gemeinsamen Ergebnis über die Effizienz der Vorbehandlung, da das PMA Gram-positive und Gram-negative Bakterien unterschiedlich gut penetrieren und sich bei Proben mit großen Partikelgrößen nicht gleichmäßig im Probengefäß verteilen kann. Testreihen in diesem Projekt bestätigen die Beobachtung, wobei vor allem die Aktivierung der Proben durch die UV-Behandlung aufgrund fehlender Geräte schwierig war (Ergebnisse nicht gezeigt). Zusätzlich zur PMA-Behandlung wurde ebenfalls ein Vergleich der RNA und DNA durchgeführt, da RNA nur in metabolisch aktiven Zellen vorliegt (Burkert *et al.*, 2019). Die Ergebnisse dieser Methode ergaben jedoch auch nach mehrmaliger Wiederholung kein eindeutiges Bild. Im Zuge der Versuchsreihen, die mit sterilem Wasser und Sediment angesetzt wurden, konnte in den Wassernullproben (siehe Anhang: „Balkendiagramme Wassernullproben“) gezeigt werden, dass sich schnell wachsende Bakterien, die als Kontamination in den Versuchsaufbau eingebracht wurden, extrem durchsetzen und den Einfluss extrazellulärer DNA minimieren. Aus diesem Grund wurde angenommen, dass durch das schnelle Wachstum der dominierenden Organismen, die toten Zellen verdrängt werden.

Eine offene Frage, die in diesem Projekt geklärt werden sollte, war die Herkunft der Organismen, die den Abbau oder die Präservierung des Weichgewebes steuern. Da die meisten der dominierenden Organismen allerdings in allen Proben, sowohl Wassernull- als auch Gewebeproben an Tag 1 nachgewiesen werden konnten, war eine eindeutige Zuordnung kaum möglich. Die Arbeit mit sterilem Wasser sollte diese Frage abschließend klären, jedoch zeigten die Ergebnisse der Versuchsreihen kein eindeutiges Bild. Denn nur weil *Clostridien* oder *Aeromonas* in den sterilen Versuchen dominieren, bedeutet das nicht, dass diese Gattungen unter unsterilen Bedingungen nicht auch aus der Umgebung kommen können. Das komplexe Zusammenspiel der Bakterien unter natürlichen Bedingungen erschwert die Analyse solcher Fragestellungen.

Zusätzlich dazu wirkt sich die Individualität (Entwicklungsstufe, Geschlecht) jedes einzelnen Organismus auf den Versuchsverlauf aus. In den Versuchsreihen wurden ganz unterschiedliche Individuen eingesetzt, die sich im Geschlecht, der Größe, des Alters und dementsprechend der Entwicklungsstufe unterscheiden haben. Das Häutungsstadium der Tiere kann sich beispielsweise auf die Bildung von Mineralien auswirken (Mähler *et al.* 2020). Durch die Verwendung der Triplicate konnte der Einfluss dieser externen Faktoren zwar minimiert, aber nicht komplett ausgeschlossen werden und wurde bei der Interpretation mit einbezogen. Eine weitere Schwierigkeit ist der Vergleich der morphologischen Veränderungen, der Ausfällung von Kristallen und der bakteriellen

Abfolge innerhalb der Versuche. Da nicht mit denselben Tieren in allen Analysen gearbeitet wurde, können die Ergebnisse nicht akkurat verglichen werden. Die morphologischen und geologischen Beobachtungen wurden von Mähler (2021) getroffen, während die mikrobiologischen Untersuchungen in diesem Projekt mit anderen Tieren durchgeführt wurden. Dieser Umstand erschwert den direkten Bezug zwischen Zerfall des Gewebes und Veränderungen in der mikrobiellen Gemeinschaft.

Generell können experimentelle Untersuchungen unter kontrollierten Bedingungen zwar helfen, bestimmte Prozesse besser zu verstehen, aber sie sind nicht in der Lage, die Natur der Dinge abzubilden. Dementsprechend ist fragwürdig ob Zerfallsexperimente wirklich Prozesse zeigen können, die final zu einem Fossil führen würden (Li *et al.*, 2013; Parry *et al.*, 2017). In den Versuchsreihen waren viele Variablen, die nicht kontrolliert werden konnten, was weitere offene Fragen aufgeworfen hat und in zukünftigen Experimenten geklärt werden sollte. Es wird empfohlen, nicht zu viele ungeklärte Parameter mit in den Versuchsaufbau einzubeziehen, da ansonsten der gesamte Prozess und der Einfluss der einzelnen Bedingungen undurchsichtig wird.

Zusammenfassung

Die komplexen Prozesse, die notwendig sind, damit aus Weichgewebe ein gut erhaltenes Fossil entstehen kann, sind für Forschende in der paläontologischen Wissenschaft weithin unbekannt. Insbesondere die Rolle der Mikroorganismen wurde bisher nicht detailliert untersucht. Da Bakterien und Pilze als finale Destruenten normalerweise vor allem für eine effiziente Zersetzung von Gewebe zuständig sind, muss der Abbau zu einem bestimmten Zeitpunkt verringert oder gestoppt werden und gleichzeitig müssen präservierende Prozesse, wie Mineralisierung, einsetzen. Die Bedingungen, die diesen komplexen Balanceakt zwischen Zersetzung und Erhalt einleiten, sind noch unbekannt und sollten in diesem Projekt untersucht werden. Aus diesem Grund wurden acht Zerfallsexperimente mit veränderten abiotischen Faktoren durchgeführt. Neben dem Sauerstoffgehalt (aerobe und anaerobe Startbedingungen), wurden zwei verschiedene Temperaturen (4 °C und 24 °C) und eine unterschiedliche, mikrobielle Besiedelung des umgebenden Wassers und Sediment (unbehandelt, steril) getestet. Über eine 16S-rRNA-Amplikon-Analyse konnte der Verlauf der bakteriellen Besiedelung des Gewebes überwacht und anschließend mit den morphologischen Veränderungen in Zusammenhang gebracht werden.

- 1) Die Versuchsaufbauten, bei denen die abiotischen Parameter verändert wurden, wiesen nur geringe Unterschiede in ihrer mikrobiellen Gemeinschaft auf.
- 2) Insgesamt konnten viele Gattungen identifiziert werden, die hauptsächlich mit dem Abbau von Weichgewebe in Verbindung gebracht werden können, was sich auch mit den morphologischen Analysen gedeckt hat. *Aeromonas* sp., *Clostridium* sp., *Acetobacteroides* sp. und *Iodobacter* sp. exprimieren alle zersetzende Exoenzyme, mit denen sie Gewebe effektiv abbauen können.
- 3) Unter kälteren Bedingungen wurde der Zerfall verringert und manche Körperteile, wie Kiemen, Ganglien und der Darm, überlebten den gesamten Versuchsablauf (V3, V4, V8).
- 4) *Aeromonas* sp. zählten in allen Experimenten zu den dominierenden Gattungen. Während sie in unsterilem Wasser (V1, V3, V5, V7, beide Temperaturen) immer verstärkt in den ersten Versuchstagen nachgewiesen werden konnten, zeigten sie bei 24 °C in sterilem Wasser (V2, V6) einen zwei-phasigen Verlauf und dominierten in kaltem, sterilem Wasser (V4, V8) den gesamten Zerfallsprozess.
- 5) Das Genus *Proteocatella*, das bereits auf Plaque und modernen Thrombolitstrukturen vorgefunden wurde, könnte einen Einfluss auf die Präzipitation von Kalzit-Kristallen haben, da es in

- Versuchsreihe 1 (aerob, 24 °C, unsteriles Seewasser) und 5 (anaerob, 24 °C, unsteriles Seewasser) verstärkt Wachstum gezeigt hat und unter diesen Bedingungen mehr Kalzit ausgefallen ist.
- 6) Eine Einordnung der beteiligten Bakterien in intrinsische und extrinsische Bakterien war anhand der verwendeten Methodik und des Versuchsaufbaus kaum möglich.
 - 7) Der Ausschluss von Sauerstoff und die Verwendung reduzierender Reagenzien führte nicht zu einer Verringerung des Zerfalls. Neben den Ergebnissen in diesem Projekt, konnten auch andere Studien keinen Consensus über diese Vermutung finden (Allison, 1988; Bartley, 1996; Briggs & Kear, 1993a, 1993b, 1994; Gostling *et al.*, 2009; Hancy & Antcliffe, 2020; Kidwell & Baumiller, 1990; Martin *et al.*, 2003). Der Zerfall war sowohl in der Gegenwart als auch in der Abwesenheit von Sauerstoff vergleichbar und, wie in Versuchsreihe 7 (anaerob, 4 °C, unsteriles Seewasser) gezeigt, unter anaeroben Bedingungen und einer Besiedelung mit der Gattung *Clostridium* sogar stärker.
 - 8) In den Zerfallsexperimenten, die in diesem Projekt durchgeführt wurden, konnte in keinem Aufbau ein Biofilm nachgewiesen werden, obwohl die detektierten Bakterien die Fähigkeit zur Bildung besaßen. Vermutlich haben äußere Einflüsse die Expression der exopolymeren Substanz verhindert. Nachfolgende Experimente, bei denen Mähler (2021) mehrmals starke Biofilme zeigen konnte, sollten für zukünftige Projekte als Vorbild genommen werden.

Die große Varianz in der metabolischen Aktivität der einzelnen Spezies innerhalb einer Gattung, die komplexen regulatorischen Netzwerke und Anpassungen an verschiedenste Bedingungen erschweren die Analyse der beteiligten Bakterien. Auch wenn die speziellen Gene im Genom der Organismen vorhanden sind, kann nicht davon ausgegangen werden, dass die Bakterien die metabolische Aktivität auch wirklich ausprägen. Eine detaillierte Analyse der mikrobiellen Stoffwechselwege könnte mit einer Transkriptom-Analyse erzielt werden. Zusätzlich dazu erschwerte die Verwendung des Seewassers natürlichen Ursprungs, das in seiner Ionen-Konzentration, der mikrobiellen Zusammensetzung und der Nährstoffe im Jahresverlauf schwankt, die Analyse der Bakterien und der metabolischen Aktivität. In zukünftigen Versuchen sollte ein kontrollierbares Medium verwendet werden und die Zugabe bestimmter Ionen oder Nährstoffe beobachtet werden. Da die Veränderungen in der bakteriellen Besiedelung von Flusskrebsen mit Hinblick auf eine mögliche Präservierung bisher noch nicht detailliert untersucht wurde, stellt dieses Projekt einen ersten Schritt dar. Auf den Ergebnissen aufbauend, könnten jetzt gezielt einzelne Bakterien in ein bekanntes, kontrolliertes Medium eingesetzt und ihr Einfluss auf den Abbau oder die Präservierung sterilen Gewebes untersucht werden.

Publizierte Kooperationsprojekte

Das Projekt zur Untersuchung der bakteriellen Aktivität auf den Zerfall und die Präservierung von Weichgewebe ist Teil der Forschergruppe FOR 2685 und als mikrobiologischer Ansprechpartner an vielfältigen, interdisziplinären Kooperationen beteiligt. Neben der engen Kooperation innerhalb des Projektes mit der Abteilung Paläontologie (Fachbereich Geowissenschaften), wurden ebenfalls Projekte mit den verschiedenen Fachbereichen der Geowissenschaften, der Chemie, Pharmazie oder Biologie durchgeführt. In den nachfolgenden Kapiteln werden zwei größere Projekte exemplarisch dargestellt. Eine detaillierte Beschreibung der Ergebnisse und der Diskussion ist in den entsprechenden Publikationen nachzulesen (Janssen *et al.*, 2021; Peris *et al.*, 2020).

DNA aus in Harz eingeschlossenen Organismen (Peris *et al.*, 2020)

Eine reichhaltige Quelle für exzellent präservierte Fossilien stellt fossiles Baumharz dar. Aufgrund verschiedener chemischer und physikalischer Eigenschaften, die teilweise mit dem Alter der Proben korrelieren, wird zwischen Harz, Copal und Bernstein unterschieden. In den 90er Jahren wurden verschiedene Studien über den Erhalt von DNA in sehr alten Bernstein-Stücken durchgeführt. Im Nachhinein konnte nachgewiesen werden, dass die aufgefundene DNA durch moderne Kontaminationen in den Versuchsaufbau eingeführt worden ist, sodass dieses Forschungsfeld für eine längere Zeit gemieden wurde. In diesem Kooperationsprojekt mit David Peris sollte untersucht werden, ob ein Nachweis von DNA auch in sehr jungen Harzproben ein Problem darstellt. Die Harzproben zeigen häufig Einschlüsse von Insekten, da das Baumharz als immunologische Reaktion auf Verletzungen des Baumes produziert werden (siehe Abbildung 35). Aus diesen Insekten sollte DNA isoliert und getestet werden.

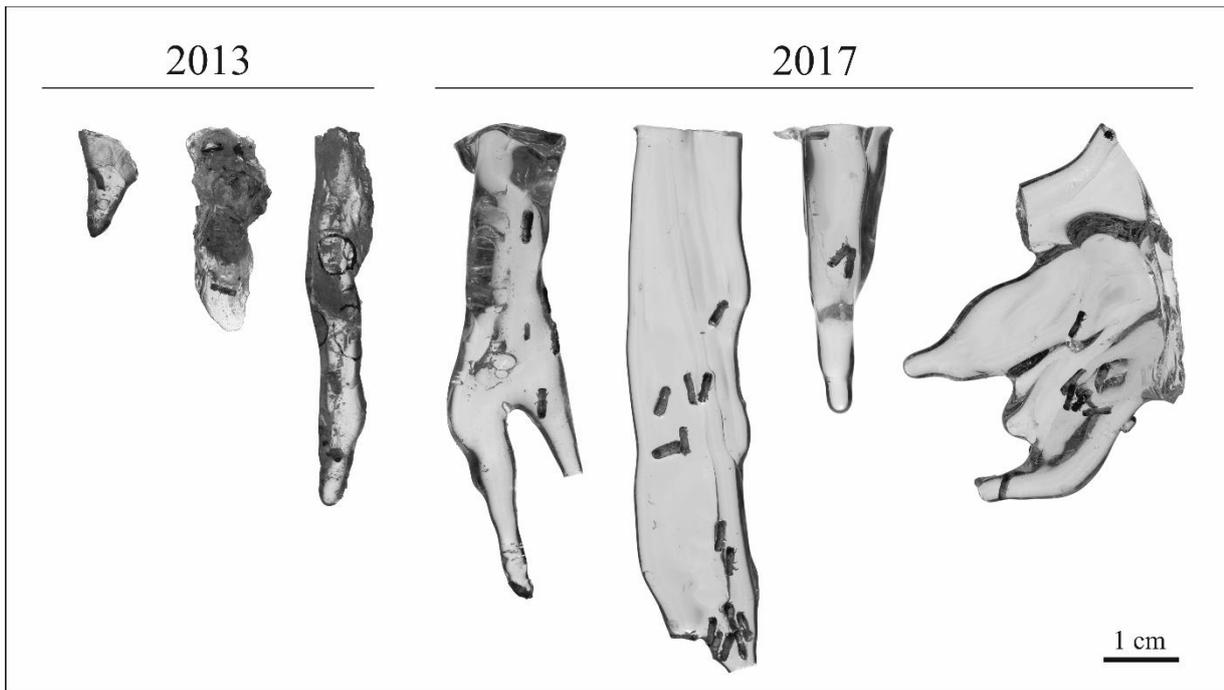


Abbildung 35: Harzproben mit eingeschlossenen Käfern der Gattung *Mitosoma* (Platypodinae). Die Proben wurden auf Madagaskar von Bäumen der Spezies *Hymenaea verrucosa* (Angiospermae: Fabaceae) bei Exkursionen in den Jahren 2013 und 2017 gesammelt.

Um die DNA von Insekten aus der Gattung *Mitosoma* (Unterfamilie: Platypodinae) amplifizieren zu können, wurden spezifische Primer anhand verschiedener Publikationen ausgewählt (McKenna & Farrell, 2005; Mugu *et al.*, 2018; Pistone *et al.*, 2016). Die Primer sind in Tabelle 26 aufgezeigt und amplifizieren die D2-D3 Domäne der großen ribosomalen Untereinheit (28S) oder das 3'-Ende der mitochondrialen Cytochrom Oxidase I (COI1).

Tabelle 26: Übersicht über die Primer, die zur Amplifikation der DNA aus *Mitosoma* sp. verwendet wurden. Die Primer wurden der vorhandenen Literatur entnommen oder auf Basis amplifizierter Fragmente neu erstellt.

Zielgen	Sequenz	Fragmentgröße	Annealing Temperatur	Literatur
Große ribosomale Untereinheit (28S)	(S3690F) GAG AGT TMA ASA GTA CGT GAA AC	~ 800 bp	55 °C	Mugu <i>et al.</i> , 2018
	(A4285R) CTG ACT TCG TCC TGA CCA GGC		55 °C	Mugu <i>et al.</i> , 2018
Cytochrom Oxidase I (COI1)	(S2442F) CCA ACA GGA ATT AAA ATT TTT AGA TGA TTA GC	~ 600 bp	49 °C	McKenna & Farrell, 2005
	(A3014R) TCC AAT GCA CTA ATC TGC CAT ATT A		49 °C	McKenna & Farrell, 2005
	(COI1Res F) CAG TAT TTG CTA TCT TAG CTG G	~ 160 bp	50 °C	Peris <i>et al.</i> , 2020
	(COI1Res R2) CGT GGT ATT CCT CTT AAA CC		50 °C	Peris <i>et al.</i> , 2020

Als Positivkontrolle wurde die DNA rezenter *Mitosoma* sp. verwendet. Die DNA-Konzentrationen, die nach der DNA-Extraktion mit dem DNeasy® Blood & Tissue - Kit an einem Mikrovolumen-UV/VIS-Spektralphotometer gemessen wurden, waren in allen Harzproben signifikant geringer, als in den rezenten Proben. Wie in Abbildung 36 dargestellt, nahm die DNA-Konzentration mit zunehmendem Alter der Proben sichtbar ab. Die geringste Konzentration und schlechteste Qualität der DNA konnte in Proben nachgewiesen werden, bei denen das Harz nicht durch mechanische Methoden, sondern durch eine Chloroform-Vorbehandlung vom Probenmaterial abgelöst wurde.

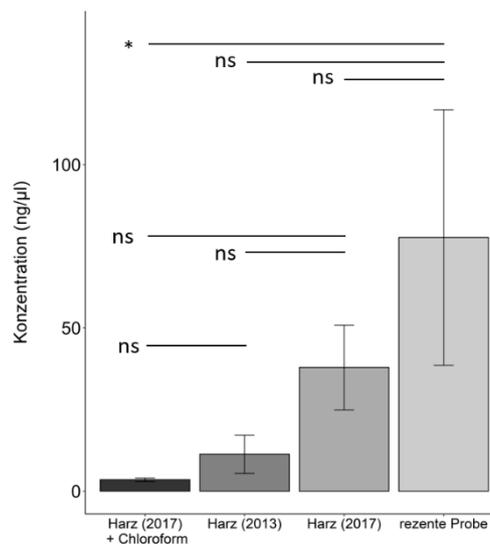


Abbildung 36: Vergleich der DNA-Konzentrationen aus *Mitosoma*-Proben verschiedenen Ursprungs. Bei einem Probensatz wurden die eingeschlossenen Käfer über eine Chloroform-Vorbehandlung aus dem Harz herausgelöst. (* = signifikanter Unterschied $P < 0.05$, ns = kein signifikanter Unterschied, berechnet mit der Benjamini-Hochberg-Anpassung)

Zu Beginn des Projektes konnten keine spezifischen Banden bei der erwarteten Größe in den Harzproben nachgewiesen werden, weswegen überprüft wurde, ob die Harzsubstanzen einen inhibitorischen Effekt auf die Polymerase zeigen. Hierfür wurden verschiedene Ansätze (siehe Tabelle 27) mit variablen Mengen der extrahierten Harzproben mit DNA rezenter Käfer gemischt.

Tabelle 27: Ergebnisse der Tests zu einer möglichen Inhibition der Polymerase durch Bestandteile des Baumharzes. Es wurden unterschiedliche Mengen *Mitosoma*-DNA aus Baumharz und aus Ethanol (rezent) vermischt und mit den Primern zur Vervielfältigung der COI-Region auf Inhibition überprüft.

Test	DNA Harzprobe	DNA rezente Probe	Ergebnisse
1	1 µl (50 ng)	0 µl (0 ng)	negativ
2	0.8 µl (40 ng)	0.2 µl (10 ng)	schwach positiv
3	0.5 µl (25 ng)	0.5 µl (25 ng)	positiv
4	0.2 µl (10 ng)	0.8 µl (40 ng)	positiv
5	0 µl (0 ng)	1 µl (50 ng)	positiv

Kein Ansatz zeigte eine Inhibition der PCR, sodass ein negativer Einfluss der Harzkomponenten ausgeschlossen wurde. Im Anschluss daran konnten mithilfe von drei verschiedenen Strategien zur Amplifikation geringer DNA-Mengen erfolgreiche Ergebnisse erzielt werden (siehe Abbildung 37).

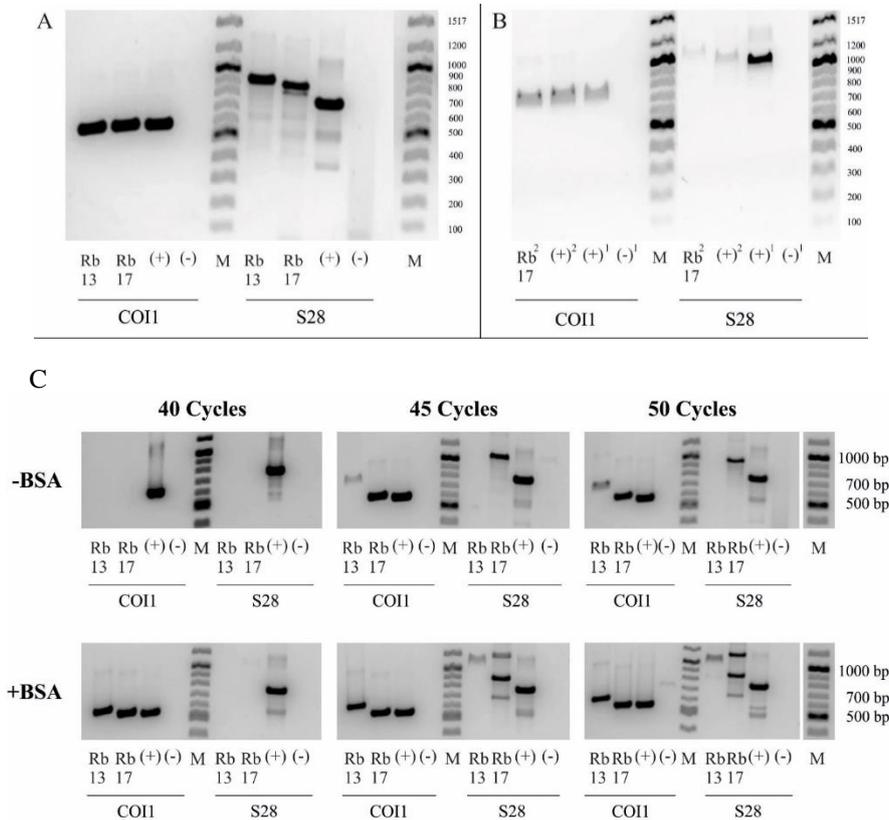


Abbildung 37: Strategien zur erfolgreichen Amplifikation der Genregionen S28 und COII aus der DNA von *Mitosoma sp.*, die unterschiedlich lange in Baumharz (2013 = Rb13, 2017 = Rb17) eingeschlossen waren. Als Positivkontrolle (+) wurde DNA einer rezenten Probe, als Negativkontrolle (-) DNase-/RNase-freies Wasser genutzt. Die Größe der DNA-Fragmente konnte anhand des verwendeten Markers (M, 100 bp DNA ladder, New England Biolabs, Frankfurt, DE) zugeordnet werden. A) Erhöhung der Zykluszahl auf 50 Zyklen. B) Verschachtelte Zwei-Schritt-PCR, bei der das PCR-Produkt zwischendurch aufgereinigt und ein frischer PCR-Ansatz angesetzt wurde. C) Durch die Zugabe von BSA konnte auch mit einer geringeren Zyklus-Zahl ein positives Ergebnis erzielt werden.

Eine Möglichkeit stellt die Erhöhung der Zyklusanzahl innerhalb des PCR-Programms dar. Je mehr Wiederholungen durchgeführt werden, desto mehr Amplifikate liegen im Ansatz vor, da sich die Menge der DNA-Kopien von Zyklus zu Zyklus verdoppelt. Ein Problem bei dieser Methode ist, dass sich mit zunehmender Zykluszahl fehlerhafte Amplifikate akkumulieren können und wichtige Bestandteile des PCR-Ansatzes mit der Zeit verbraucht werden (z.B. dNTPS, Primer). Auf einer ähnlichen Überlegung basiert der Ansatz einer „verschachtelten Zwei-Schritt-PCR“, bei der zwei PCR-Läufe hintereinander durchgeführt werden. Der Vorteil dieser Vorgehensweise ist, dass einzelne wichtige Bestandteile, wie dNTPs oder Primer, durch das frische Ansetzen nach ungefähr 25

Zyklen, ausreichend vorhanden sind. Bei einer Erhöhung der Zyklusanzahl könnten diese Verbrauchsmaterialien den Erfolg limitieren. Zusätzlich zu diesen zwei Strategien, wurde ebenfalls Bovines Serum Albumin (BSA, New England Biolabs, Frankfurt, DE) zum Ansatz hinzugegeben. Das Protein, das aus dem Blutplasma gewonnen wird, kann PCR-Inhibitoren binden und wird somit häufig zu Ansätzen hinzugegeben, bei denen ein negativer Effekt solcher Moleküle auf die DNA-Polymerase befürchtet werden kann.

Bei diesem Projekt lag ein Fokus auf der Authentizität der Ergebnisse. Da in den frühen Studien zu DNA aus Bernstein häufig moderne Kontaminationen die Ergebnisse verfälscht haben, muss nicht nur auf ein besonders sauberes Arbeiten geachtet werden, sondern auch darauf, dass die nachgewiesene DNA wirklich dem Studienorganismen zugeordnet werden kann. Eine mögliche Kontaminationsquelle stellte in diesen Experimenten die Positivkontrolle mit der rezenten DNA aus *Mitosoma* sp. dar, weswegen verschiedene Kontrollpunkte innerhalb der Versuchsreihe implementiert wurden. Die unterschiedlichen Proben wurden aufgereinigt und sequenziert, sodass im Anschluss ein direkter Vergleich der Sequenzen aus rezenten Käfer- und Harzproben durchgeführt werden konnte. Wie beispielhaft in Tabelle 28 dargestellt ist, wurden zuerst die einzelnen Sequenzen aus der DNA der in Harz eingeschlossenen Käfer miteinander verglichen. Hierbei wurde deutlich, dass die Sequenzen zwischen den Spezies, die in verschiedenen Jahren gesammelt wurden, sehr ähnlich sind (97,4 % Ähnlichkeit). Außerdem konnte anhand der geringeren Ähnlichkeit (< 75 %) zu den rezenten Proben eine Kontamination mit der Positivkontrolle eindeutig ausgeschlossen werden.

Tabelle 28: Ergebnisse der Sequenzvergleiche von DNA aus in Harz eingeschlossenen und rezenten Käfern. Die Alignments wurden mit dem Tool Geneious (version: 10.2.3.) durchgeführt. Hierbei sollte ausgeschlossen werden, dass die positiven Ergebnisse mit der älteren Mitosoma-DNA auf einer Kontamination mit der rezenten Positivkontrolle beruhen.

Sequenzen	Primer	Ähnlichkeit [%]
Harzkäfer (2013 + 2017)	COI1 (Original)	97,4
Harzkäfer (2013 + 2017)	S28	97,8
Harzkäfer (2013 + 2017) im Vergleich zu rezentem Käfer	COI1 (Original)	73,7
Harzkäfer (2013 + 2017) im Vergleich zu rezentem Käfer	S28	52,5

In diesen Versuchen sollte die generelle Frage geklärt werden, ob eine Amplifikation von DNA aus Harzproben möglich ist. In den bisherigen Publikationen wurde lediglich mit sehr altem Probenmaterial gearbeitet, sodass unbekannt war, ob wirklich keine DNA in den Proben vorlag oder

ob Harzkomponenten oder andere Schritte innerhalb der Präparation eine Vervielfältigung der DNA inhibieren. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen zeigen deutlich, dass DNA aus sehr jungen Proben erfolgreich isoliert werden kann, die vorliegende DNA-Konzentration jedoch mit der Zeit abnimmt. In zukünftigen Experimenten sollen nun die zeitlichen Limitationen der DNA-Amplifikation aus Harz- oder Bernsteinproben ermittelt werden. Hierfür soll das Alter der untersuchten Proben Schritt für Schritt vergrößert werden. Da sich die DNA im Verlauf der Zeit aufgrund von natürlichen Alterungs- und Abbauprozessen, wie Fragmentierung durch Strangbruch oder Depurierung stark verändern kann, sollte in den weiteren Versuchen mit anderen Primern gearbeitet werden. Es wird davon ausgegangen, dass eine Fragmentlänge von 160 bp für alte DNA-Proben ideal ist. Aus diesem Grund wurde auf der Basis der amplifizierten DNA aus Harzproben ein neues Primerpaar (siehe Tabelle 26, COI1Res F + COI1Res R2) erstellt und getestet. In Abbildung 38 ist ein Fragment der Länge 180 bp dargestellt und zeigt eine erfolgreiche Amplifikation der DNA mit den neuen Primern.

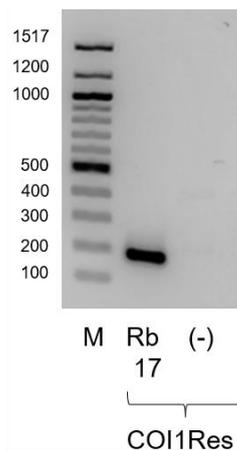


Abbildung 38: Überprüfung der Primer COI1Res zur Vervielfältigung sehr kleiner DNA-Fragmente aus älteren Mitosoma-Proben. Die Primer wurden auf Basis der amplifizierten DNA aus den in Harz eingeschlossenen Käfern erstellt. Da DNA mit der Zeit immer mehr fragmentiert, sollten zukünftige Versuche mit älteren Käfer-Proben mit den neuen Primern durchgeführt werden. Als Negativkontrolle (-) wurde DNase-/RNase-freies Wasser verwendet. Die Größe der DNA-Fragmente konnte anhand des verwendeten Markers (M, 100 bp DNA ladder, New England Biolabs, Frankfurt, DE) zugeordnet werden.

Mikrobielle Diversität auf Seerosenblättern: Vergleich von vier DNA-Extraktions-Methoden (Janssen *et al.*, 2021)

In der Vorbereitung auf die zweite Förderperiode, in der der Fokus von tierischem auf pflanzliches Weichgewebe verschoben werden soll, wurde die Methodik zur DNA-Extraktion von Blattoberflächen in Kooperation mit Carole T. Gee untersucht. Zu diesem Zweck wurden verschiedene Kits zur Aufreinigung von DNA mithilfe einer bekannten mikrobiellen Gemeinschaft („Mock“) getestet (vgl. Abschnitt 3.2.). Da die Zusammensetzung der Probe bekannt ist, kann daraus die Effektivität des Kits abgeleitet werden. In diesen Versuchen wurden vier Kits, DNeasy® PowerWater® Kit (Kit 1), DNeasy® PowerSoil® Kit (Kit 2), E.Z.N.A.® Water DNA Kit (Kit 3), und FastDNA™ Spin Kit for Soil (Kit 4) überprüft. Die Kits wurden zuvor bereits für die Analyse von Pflanzen-assoziierten Mikrobiomen genutzt (Qiu *et al.*, 2020; Sare *et al.*, 2020; Tláskal *et al.*, 2016; Zhao *et al.*, 2017). Lediglich das DNeasy PowerWater Kit wurde zuvor noch nicht mit Pflanzenmaterial getestet, sondern nur für die Analyse von Wassermikrobiomen und die Verteilung von Resistenzgenen in aquatischen Habitaten eingesetzt (Rocha & Manaia, 2020).

Da in den Versuchen das Mikrobiom der Blattoberfläche untersucht werden sollte, musste dieses durch eine Ultraschall-Behandlung in speziellem Puffer abgelöst werden. Um die DNA der Bakterien extrahieren zu können, musste der Puffer dann über eine Vakuum-Filtration durch eine feinporige Membran (0,25 µm) gefiltert werden. Der Filter konnte anschließend in den ersten Schritt des Aufreinigungsprotokoll eingesetzt werden, bei dem die Bakterien lysiert und dadurch die DNA freigesetzt wird. Da die Mock-Gemeinschaft identisch zum späteren Probenmaterial prozessiert werden sollte, wurden 75 µl in den Puffer gegeben und dieser anschließend gefiltert. Im Anschluss daran wurden die Proben, wie vom Hersteller angegeben, aufgereinigt. Ein erster Unterschied in der Effizienz der Kits wurde bei der Betrachtung der DNA-Konzentrationen sichtbar (siehe Abbildung 39 A).

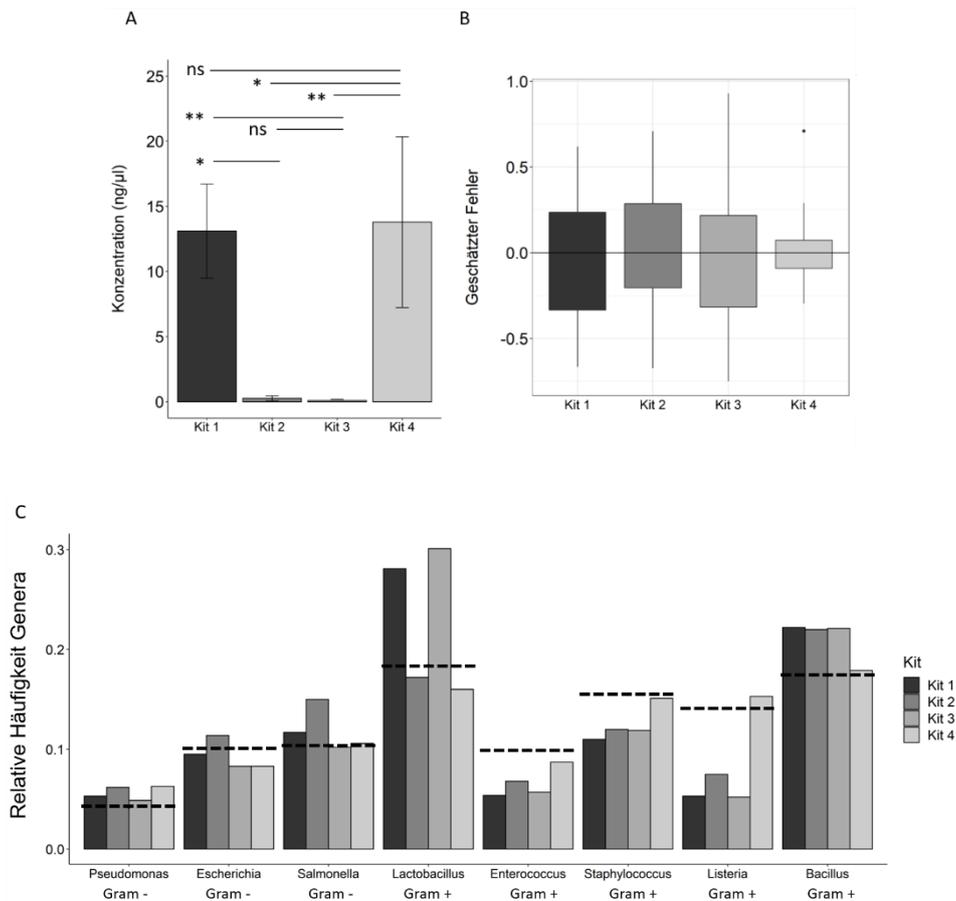


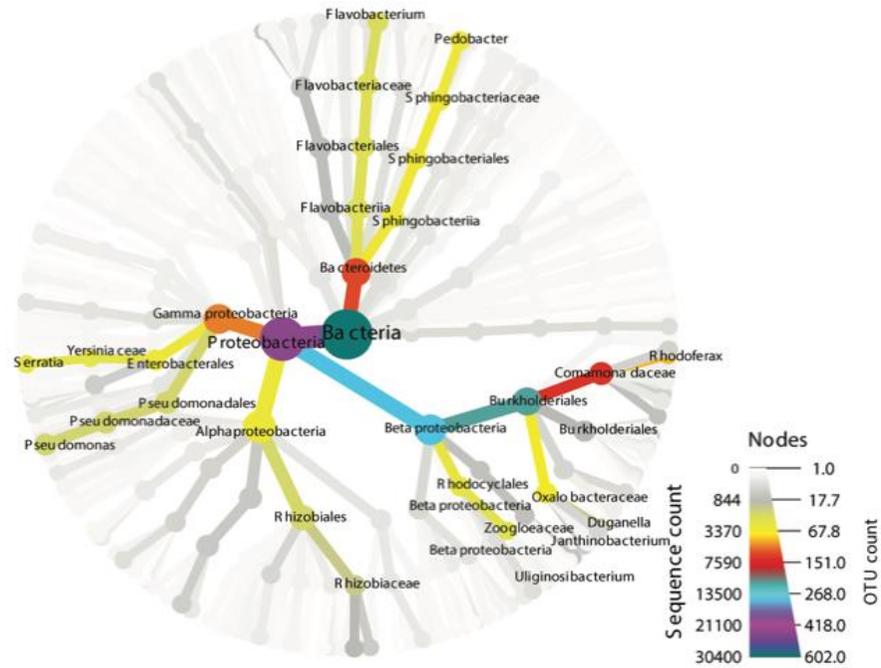
Abbildung 39: Ergebnisse der DNA-Extraktion und 16S-rRNA-Amplikon-Analyse der bekannten, mikrobiellen Gemeinschaft (ZymoBIOMICS Microbial Community Standard). Der Standard wurde mit vier verschiedenen Kits nach Herstellerangaben aufgereinigt. A) Konzentrationen (ng/µl) der aufgereinigten DNA. Die Signifikanz (P-Wert) wurde mithilfe der Benjamini-Hochberg-Dunn-Anpassung berechnet. ** = $P < 0,01$, * = $P < 0,05$, ns = nicht signifikant. B) Mittlerer geschätzter Fehler der Häufigkeit der acht Genera. Je geringer der Fehler um 0 variiert, desto besser bildet die mikrobielle Gemeinschaft den Standard ab. C) Relative Verteilung der einzelnen Gattungen des Standards in den verschiedenen Kits. Der Standard ist auch acht verschiedenen Bakterienspezies zusammengesetzt, die aufgrund ihrer Zellwandzusammensetzung ein unterschiedliches Lyseverhalten aufweisen. Die gestrichelte Linie zeigt die ideale Häufigkeit (%) der 16S-Amplikons der einzelnen Genera, wie vom Hersteller angegeben.

Die höchste DNA-Konzentration konnte mit Kit 4 erreicht werden (13,79 ng/µl), gefolgt von Kit 1 (13,1 ng/µl). Im Gegensatz dazu zeigten Kit 2 und Kit 3 sehr geringe Konzentrationen unterhalb von 1 ng/µl. Neben der DNA-Menge konnte mit Kit 4 die bekannte mikrobielle Gemeinschaft am genauesten abgebildet werden. Wie in Abbildung 39 C zu sehen, wichen die tatsächlichen Häufigkeiten der getesteten Bakterien bei Kit 4 am wenigsten von der idealen Menge ab und der mittlere Einschätzungsfehler („Estimation Error“) ist ebenfalls nur gering im Vergleich zu den anderen Kits (siehe Abbildung 39 B).

Im Anschluss an die Auswahl des idealen Kits wurde mit Kit 4 das Oberflächen-assoziierte Mikrobiom von Pflanzenproben untersucht. Es wurden Seerosen des Genus *Nymphaeae* sp.

(Nymphaeaceae) aus zwei verschiedenen Wassertiefen („floating/subsurface“) aus einem natürlichen Gewässer entnommen und die 16S-rRNA-Amplikons analysiert. Dabei sollte getestet werden, ob sich die bakterielle Zusammensetzung je nach Zerfallsstadium unterscheidet und so Rückschlüsse auf die Rolle bestimmter Bakterien im Zerfalls- oder Präservierungsprozess gezogen werden können. Allerdings konnte kaum ein Unterschied zwischen den beiden Blatttypen nachgewiesen werden (siehe Abbildung 40). Scheinbar waren die abgestorbenen Blätter in einem ähnlichen Verwesungsstadium, sodass in zukünftigen Versuchen Blattmaterial aus unterschiedlichen Wassertiefen beprobt werden sollte.

A



B

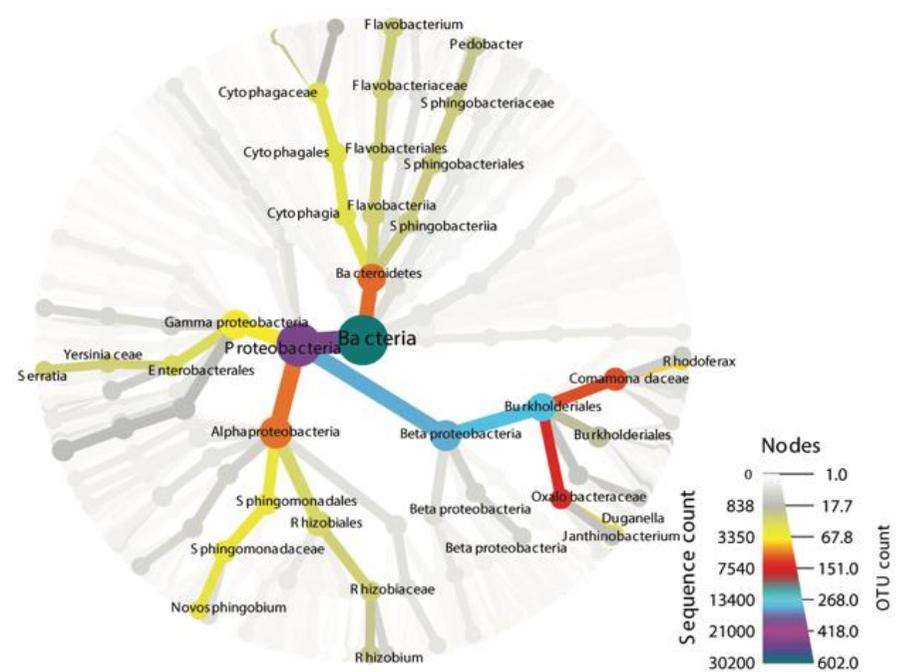


Abbildung 40: Vergleich der mikrobiellen Gemeinschaft anhand der taxonomischen Ränge in zwei verschiedenen Blattproben. A) Mikrobiom der Blattproben, die von der Wasseroberfläche gesammelt wurden. B) Mikrobiom der Blattproben, die unterhalb der Wasseroberfläche gesammelt wurden.

Literaturverzeichnis

- Albertsen, M., Karst, S. M., Ziegler, A. S., Kirkegaard, R. H., & Nielsen, P. H. (2015). Back to basics - The influence of DNA extraction and primer choice on phylogenetic analysis of activated sludge communities. *PLoS ONE*, *10*(7), 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0132783>
- Allentoft, M. E., Collins, M., Harker, D., Haile, J., Oskam, C. L., Hale, M. L., Campos, P. F., Samaniego, J. A., Gilbert, T. P. M., Willerslev, E., Zhang, G., Scofield, R. P., Holdaway, R. N., & Bunce, M. (2012). The half-life of DNA in bone: Measuring decay kinetics in 158 dated fossils. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, *279*(1748), 4724–4733. <https://doi.org/10.1098/rspb.2012.1745>
- Allison, P. A. (1988). The role of anoxia in the decay and mineralization of proteinaceous macro-fossils. *Paleobiology*, *2*(2), 139–154. <https://doi.org/10.1017/S009483730001188X>
- Allison, P. A., & Briggs, D. E. (1991). *Taphonomy: releasing the data locked in the fossil record* (Issue 56.012 TAP).
- Almeida, A., Mitchell, A. L., Tarkowska, A., & Finn, R. D. (2018). Benchmarking taxonomic assignments based on 16S rRNA gene profiling of the microbiota from commonly sampled environments. *GigaScience*, *7*(5), 1–10. <https://doi.org/10.1093/gigascience/giy054>
- Arp, G., Reimer, A., & Reitner, J. (2003). Microbialite formation in seawater of increased alkalinity, Satonda Crater Lake, Indonesia. *Journal of Sedimentary Research*, *73*(1), 105–127. <https://doi.org/10.1306/081503740318>
- Arp, G., Helms, G., Karlinska, K., Schumann, G., Reimer, A., Reitner, J., & Trichet, J. (2012). Photosynthesis versus exopolymer degradation in the formation of microbialites on the Atoll of Kiritimati, Republic of Kiribati, Central Pacific. *Geomicrobiology Journal*, *29*(1), 29–65. <https://doi.org/10.1080/01490451.2010.521436>
- Arratia, G., Schultze, H.-P., Tischlinger, H., & Viohl, G. (2015). Solnhofen. *Ein Fenster in Die Jurazeit*, München, Deutschland: Pfeil-Verlag
- Baas, M. (1995). Selective preservation of chitin during the decay of shrimp. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, *59*(5), 945–951. [https://doi.org/10.1016/00167-0379\(50\)00127-](https://doi.org/10.1016/00167-0379(50)00127-)
- Bader, O. (2013). MALDI-TOF-MS-based species identification and typing approaches in medical mycology. *Proteomics*, *13*(5), 788–799. <https://doi.org/10.1002/pmic.201200468>
- Barathi, S., Meng, Y., Yu, Z., Ni, S. Q., & Meng, F. (2021). Roles of nitrite in mediating the composition and metacommunity of multispecies biofilms. *Journal of Water Process Engineering*, *40*(101764). <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2020.101764>
- Barbieri, G., Albertini, A. M., Ferrari, E., Sonenshein, A. L., & Belitsky, B. R. (2016). Interplay of CodY and ScoC in the regulation of major extracellular protease genes of *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, *198*(6), 907–920. <https://doi.org/10.1128/JB.00894-15>
- Bartley, J. K. (1996). Actualistic taphonomy of Cyanobacteria: Implications for the Precambrian fossil record. *Palaios*, *11*(6), 571–586. <https://doi.org/10.2307/3515192>
- Baumgartner, L. K., Reid, R. P., Dupraz, C., Decho, A. W., Buckley, D. H., Spear, J. R., Przekop, K. M., & Visscher, P. T. (2006). Sulfate reducing bacteria in microbial mats: Changing paradigms, new discoveries. *Sedimentary Geology*, *185*(3-4), 131–145. <https://doi.org/10.1016/j.sedgeo.2005.12.008>
- Bazylnski, D. A., & Frankel, R. B. (2003). Biologically controlled mineralization in Prokaryotes. *Reviews in Mineralogy and Geochemistry*, *54*(1), 217–247. <https://doi.org/10.2113/0540217>

- Beblo-Vranesevic, K., Bohmeier, M., Perras, A. K., Schwendner, P., Rabbow, E., Moissl-Eichinger, C., Cockell, C. S., Pukall, R., Vannier, P., Marteinsson, V. T., Monaghan, E. P., Ehrenfreund, P., Garcia-Descalzo, L., Gómez, F., Malki, M., et al. (2017). The responses of an anaerobic microorganism, *Yersinia intermedia* MASE-LG-1 to individual and combined simulated Martian stresses. *PLoS ONE*, *12*(10), 1–19. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185178>
- Benbow, M. E., Pechal, J. L., Lang, J. M., Erb, R., & Wallace, J. R. (2015). The Potential of high-throughput metagenomic sequencing of aquatic bacterial communities to estimate the postmortem submersion interval. *Journal of Forensic Sciences*, *60*(6), 1500–1510. <https://doi.org/10.1111/1556-4029.12859>
- Bera, A., Herbert, S., Jakob, A., Vollmer, W., & Götz, F. (2005). Why are pathogenic staphylococci so lysozyme resistant? The peptidoglycan O-acetyltransferase OatA is the major determinant for lysozyme resistance of *Staphylococcus aureus*. *Molecular Microbiology*, *55*(3), 778–787. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04446.x>
- Berner, R. A. (1969). Migration of iron and sulfur within anaerobic sediments during early diagenesis. *American Journal of Science*, *267*(1), 19–42. <https://doi.org/10.2475/ajs.267.1.19>
- Bhattacharya, D., Nagpure, A., & Gupta, R. K. (2007). Bacterial chitinases: properties and potential. *Critical Reviews in Biotechnology*, *27*(1), 21–28. <https://doi.org/10.1080/07388550601168223>
- Bickel, S. L., & Tang, K. W. (2010). Microbial decomposition of proteins and lipids in copepod versus rotifer carcasses. *Marine Biology*, *157*(7), 1613–1624. <https://doi.org/10.1007/s00227-010-1434-4>
- Biscarini, F., Palazzo, F., Castellani, F., Masetti, G., Grotta, L., Cichelli, A., & Martino, G. (2018). Rumen microbiome in dairy calves fed copper and grape-pomace dietary supplementations: Composition and predicted functional profile. *PLoS ONE*, *13*(11), 1–20. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0205670>
- Bolhuis, H., Fillinger, L., & Stal, L. J. (2013). Coastal microbial mat diversity along a natural salinity gradient. *PLoS ONE*, *8*(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063166>
- Bolhuis, H., & Stal, L. J. (2011). Analysis of bacterial and archaeal diversity in coastal microbial mats using massive parallel 16S rRNA gene tag sequencing. *ISME Journal*, *5*(11), 1701–1712. <https://doi.org/10.1038/ismej.2011.52>
- Bolyen, E., Rideout, J. R., Dillon, M. R., Bokulich, N. A., Abnet, C. C., Al-Ghalith, G. A., Alexander, H., Alm, E. J., Arumugam, M., Asnicar, F., Bai, Y., Bisanz, J. E., Bittinger, K., Brejnrod, A., Brislawn, C. J., et al. (2019). Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nature Biotechnology*, *37*(8), 852–857. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0209-9>
- Bonilla-Rosso, G., Peimbert, M., Alcaraz, L. D., Hernández, I., Eguiarte, L. E., Olmedo-Alvarez, G., & Souza, V. (2012). Comparative metagenomics of two microbial mats at Cuatro Ciénegas Basin II: Community structure and composition in oligotrophic environments. *Astrobiology*, *12*(7), 659–673. <https://doi.org/10.1089/ast.2011.0724>
- Bontognali, T. R. R., Sessions, A. L., Allwood, A. C., Fischer, W. W., Grotzinger, J. P., Summons, R. E., & Eiler, J. M. (2012). Sulfur isotopes of organic matter preserved in 3.45-billion-year-old stromatolites reveal microbial metabolism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *109*(38), 15146–15151. <https://doi.org/10.1073/pnas.1207491109>
- Boquet, E., Boronat, A., & Ramos-Cormenzana, A. (1973). Production of calcite (calcium carbonate) crystals by soil bacteria is a general phenomenon. *Nature*, *246*, 527–529. <https://doi.org/10.1038/246421a0>
- Braissant, O., Cailleau, G., Dupraz, C., & Verrecchia, E. P. (2003). Bacterially induced mineralization of calcium carbonate in terrestrial environments: The role of exopolysaccharides and amino acids. *Journal of Sedimentary Research*, *73*(3), 485–490. <https://doi.org/10.1306/111302730485>

- Braissant, O., Decho, A. W., Dupraz, C., Glunk, C., Przekop, K. M., & Visscher, P. T. (2007). Exopolymeric substances of sulfate-reducing bacteria: Interactions with calcium at alkaline pH and implication for formation of carbonate minerals. *Geobiology*, 5(4), 401–411. <https://doi.org/10.1111/j.1472-4669.2007.00117.x>
- Braissant, O., Decho, A. W., Przekop, K. M., Gallagher, K. L., Glunk, C., Dupraz, C., & Visscher, P. T. (2009). Characteristics and turnover of exopolymeric substances in a hypersaline microbial mat. *FEMS Microbiology Ecology*, 67(2), 293–307. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2008.00614.x>
- Brandt, J., & Albertsen, M. (2018). Investigation of detection limits and the influence of DNA extraction and primer choice on the observed microbial communities in drinking water samples using 16S rRNA gene amplicon sequencing. *Frontiers in Microbiology*, 9(2140), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02140>
- Brasier, M. D., & Wacey, D. (2012). Fossils and astrobiology: New protocols for cell evolution in deep time. *International Journal of Astrobiology*, 11(4), 217–228. <https://doi.org/10.1017/S1473550412000298>
- Briggs, D. E. G., & Kear, A. J. (1993a). Decay and preservation of polychaetes: Taphonomic thresholds in soft-bodied organisms. *Paleobiology*, 19(1), 107–135. <https://doi.org/10.1017/S0094837300012343>
- Briggs, D. E. G., & Kear, A. J. (1993b). Decay of Branchiostoma: implications for soft-tissue preservation in conodonts and other primitive chordates. *Lethaia*, 26(4), 275–287. <https://doi.org/10.1111/j.1502-3931.1993.tb01532.x>
- Briggs, D. E. G., & Kear, A. J. (1993c). Fossilization of soft tissue in the laboratory. *Science*, 259(5100), 1439–1442. <https://doi.org/10.1126/science.259.5100.1439>
- Briggs, D. E. G., & Kear, A. J. (1994). Decay and mineralization of Shrimps. *Palaios*, 9(5), 431–456.
- Briggs, D. E. G. (1995). Preservation of soft tissues in the fossil record. *Eclogae Geologicae Helveticae*, 88(3), 623–626.
- Briggs, D. E. G., Raiswell, R., Bottrell, S. H., Hatfield, D. T., & Bartels, C. (1996). Controls on the pyritization of exceptionally preserved fossils; an analysis of the Lower Devonian Hunsrueck Slate of Germany. *American Journal of Science*, 296(6), 633–663.
- Briggs, D. E. G., & Wilby, P. R. (1996). The role of the calcium carbonate-calcium phosphate switch in the mineralization of soft-bodied fossils. *Journal of the Geological Society*, 153(5), 665–668. <https://doi.org/10.1144/gsjgs.153.5.0665>
- Briggs, D. E. G. (1999). Molecular taphonomy of animal and plant cuticles: Selective preservation and diagenesis. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 354(1379), 7–17. <https://doi.org/10.1098/rstb.1999.0356>
- Briggs, D. E. G. (2001). Exceptionally preserved Fossils. In *Paleobiology II*, 328–332.
- Briggs, D. E. G. (2003). The role of decay and mineralization in the preservation of soft-bodied fossils. *Annual Review of Earth and Planetary Sciences*, 31, 275–301. <https://doi.org/10.1146/annurev.earth.31.100901.144746>
- Briggs, D. E. G., & Summons, R. E. (2014). Ancient biomolecules: Their origins, fossilization, and role in revealing the history of life. *BioEssays*, 36(5), 482–490. <https://doi.org/10.1002/bies.201400010>
- Briggs, D. E. G., & McMahon, S. (2016). The role of experiments in investigating the taphonomy of exceptional preservation. *Palaeontology*, 59(1), 1–11. <https://doi.org/10.1111/pala.12219>
- Brock, F., Parkes, R. J., & Briggs, D. E. G. (2006). Experimental pyrite formation associated with decay of plant material. *Palaios*, 21(5), 499–506. <https://doi.org/10.2110/palo.2005.p05-077r>

- Brocks, J. J., Love, G. D., Summons, R. E., Knoll, A. H., Logan, G. A., & Bowden, S. A. (2005). Biomarker evidence for green and purple sulphur bacteria in a stratified Palaeoproterozoic sea. *Nature*, *437*(7060), 866–870. <https://doi.org/10.1038/nature04068>
- Brocks, J. J., & Pearson, A. (2005). Building the biomarker tree of life. *Reviews in Mineralogy and Geochemistry*, *59*(1), 233–258. <https://doi.org/10.2138/rmg.2005.59.10>
- Brundin, M., Figdor, D., Sundqvist, G., & Sjögren, U. (2013). DNA binding to hydroxyapatite: A potential mechanism for preservation of microbial DNA. *Journal of Endodontics*, *39*(2), 211–216. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2012.09.013>
- Buchholz-Cleven, B. E. E., Rattunde, B., & Straub, K. L. (1997). Screening for genetic diversity of isolates of anaerobic Fe(II)-oxidizing bacteria using DGGE and whole-cell hybridization. *Systematic and Applied Microbiology*, *20*(2), 301–309. [https://doi.org/10.1016/S0723-2020\(97\)80077-X](https://doi.org/10.1016/S0723-2020(97)80077-X)
- Burcham, Z. M., Hood, J. A., Pechal, J. L., Krausz, K. L., Bose, J. L., Schmidt, C. J., Benbow, M. E., & Jordan, H. R. (2016). Fluorescently labeled bacteria provide insight on post-mortem microbial transmigration. *Forensic Science International*, *264*, 63–69. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2016.03.019>
- Burcham, Z. M., Pechal, J. L., Schmidt, C. J., Bose, J. L., Rosch, J. W., Benbow, M. E., & Jordan, H. R. (2019). Bacterial community succession, transmigration, and differential gene transcription in a controlled vertebrate decomposition model. *Frontiers in Microbiology*, *10*(MAR), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00745>
- Burkert, A., Douglas, T. A., Waldrop, M. P., & Mackelprang, R. (2019). Changes in the active, dead, and dormant microbial community structure across a pleistocene permafrost chronosequence. *Applied and Environmental Microbiology*, *85*(7), 1–16. <https://doi.org/10.1128/AEM.02646-18>
- Burton, E. A., & Walter, L. M. (1990). The role of pH in phosphate inhibition of calcite and aragonite precipitation rates in seawater. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, *54*(3), 797–808. [https://doi.org/10.1016/0016-7037\(90\)90374-T](https://doi.org/10.1016/0016-7037(90)90374-T)
- Buscalioni, A. D., & Frenegal-Martínez, M. A. (2010). A holistic approach to the palaeoecology of Las Hoyas Konservat-Lagerstätte (La Huérguina Formation, Lower Cretaceous, Iberian Ranges, Spain). *Journal of Iberian Geology*, *36*(2), 297–326. <https://doi.org/10.5209/rev>
- Busscher, H. J., Cowan, M. M., & van der Mei, H. C. (1992). On the relative importance of specific and non-specific approaches to oral microbial adhesion. *FEMS Microbiology Letters*, *88*(3–4), 199–209. [https://doi.org/10.1016/0378-1097\(92\)90803-V](https://doi.org/10.1016/0378-1097(92)90803-V)
- Butler, A. D., Cunningham, J. A., Budd, G. E., & Donoghue, P. C. J. (2015). Experimental taphonomy of artemia reveals the role of endogenous microbes in mediating decay and fossilization. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, *282*(1808), 1–10. <https://doi.org/10.1098/rspb.2015.0476>
- Button, D. K. (1993). Nutrient-limited microbial growth kinetics: overview and recent advances. *Antonie van Leeuwenhoek*, *63*(3–4), 225–235. <https://doi.org/10.1007/BF00871220>
- Callahan, B. J., McMurdie, P. J., Rosen, M. J., Han, A. W., Johnson, A. J. A., & Holmes, S. P. (2016). DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods*, *13*(7), 581–583. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3869>
- Campoli-Richards, D. M., Monk, J. P., Price, A., Benfield, P., Todd, P. A., & Ward, A. (1988). Ciprofloxacin. *Drugs*, *35*(4), 373–447. <https://doi.org/10.2165/00003495-198835040-00003>
- Canfield, D. E., & Raiswell, R. (1991). Pyrite formation and fossil preservation. In *Taphonomy: releasing the data locked in the fossil record*, *Topics in Geobiology*, *9*, 337–387. Plenum Press.

- Canfield, D. E. (1994). Factors influencing organic carbon preservation in marine sediments. *Chemical Geology*, 114(3–4), 315–329. [https://doi.org/10.1016/0009-2541\(94\)90061-2](https://doi.org/10.1016/0009-2541(94)90061-2)
- Cantrell, S. A., & Duval-Perez, L. (2012). Microbial mats: An ecological niche for fungi. *Frontiers in Microbiology*, 3(NOV), 1–7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00424>
- Caporaso, J. G., Lauber, C. L., Walters, W. A., Berg-Lyons, D., Lozupone, C. A., Turnbaugh, P. J., Fierer, N., & Knight, R. (2011). Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(Supplement 1), 4516–4522. <https://doi.org/10.1073/pnas.1000080107>
- Caporaso, J. G., Lauber, C. L., Walters, W. A., Berg-Lyons, D., Huntley, J., Fierer, N., Owens, S. M., Betley, J., Fraser, L., Bauer, M., Gormley, N., Gilbert, J. A., Smith, G., & Knight, R. (2012). Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. *ISME Journal*, 6(8), 1621–1624. <https://doi.org/10.1038/ismej.2012.8>
- Carpenter, K. (2005). Experimental investigation of the role of bacteria in bone fossilization. *Neues Jahrbuch Für Geologie Und Palaontologie - Monatshefte*, 2005(2), 83–94. <https://doi.org/10.1127/njgpm/2005/2005/83>
- Carter, D. O., & Tibbett, M. (2006). Microbial decomposition of skeletal muscle tissue (*Ovis aries*) in a sandy loam soil at different temperatures. *Soil Biology and Biochemistry*, 38(5), 1139–1145. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2005.09.014>
- Carter, D. O., Junkins, E. N., & Kodama, W. A. (2017). A primer on microbiology. In *Forensic Microbiology*, Carter, D. O., Tomberlin, J. K., Benbow, M. E., & Metcalf, J. L. (Eds.). John Wiley & Sons.
- Casamayor, E. O., Massana, R., Benlloch, S., Øvreås, L., Díez, B., Goddard, V. J., Gasol, J. M., Joint, I., Rodríguez-Valera, F., & Pedrós-Alió, C. (2002). Changes in archaeal, bacterial and eukaryal assemblages along a salinity gradient by comparison of genetic fingerprinting methods in a multipond solar saltern. *Environmental Microbiology*, 4(6), 338–348. <https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2002.00297.x>
- Castro, L., Zhang, R., Muñoz, J. A., González, F., Blázquez, M. L., Sand, W., & Ballester, A. (2014). Characterization of exopolymeric substances (EPS) produced by *Aeromonas hydrophila* under reducing conditions. *Biofouling*, 30(4), 501–511. <https://doi.org/10.1080/08927014.2014.892586>
- Cavari, B. Z., Allen, D. A., & Colwell, R. R. (1981). Effect of temperature on growth and activity of *Aeromonas* spp. and mixed bacterial populations in the Anacostia River. *Applied and Environmental Microbiology*, 41(4), 1052–1054. <https://doi.org/10.1128/aem.41.4.1052-1054.1981>
- Chen, X., Di, P., Wang, H., Li, B., Pan, Y., Yan, S., & Wang, Y. (2015). Bacterial community associated with the intestinal tract of Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) farmed in Lake Tai, China. In *PLoS ONE* (Vol. 10, Issue 4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0123990>
- Chen W., Simpson, J. & Levesque C. A. (2018). RAM: R for Amplicon-Sequencing-Based Microbial-Ecology. R package version 1.2.1.7. <https://CRAN.R-project.org/package=RAM>
- Cheng, Z., Meng, X., Wang, H., Chen, M., & Li, M. (2014). Isolation and characterization of broad spectrum coaggregating bacteria from different water systems for potential use in bioaugmentation. *PLoS ONE*, 9(4), 1–8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0094220>
- Cheung, M. K., Yip, H. Y., Nong, W., Tik, P., & Law, W. (2015). Rapid change of microbiota diversity in the gut but not the hepatopancreas during gonadal development of the new shrimp model *Neocaridina denticulata*. *Marine Biotechnology*, 17(6), 811–819. <https://doi.org/10.1007/s10126-015-9662-8>
- Christensen, W. B. (1946). Urea decomposition as a means of differentiating *Proteus* and *Paracolon* cultures from each other and from *Salmonella* and *Shigella* types. *Journal of Bacteriology*, 52(4), 461–466. <https://doi.org/10.1128/jb.52.4.461-466.1946>

- Chun, L. P., Miguel, M. J., Junkins, E. N., Forbes, S. L., & Carter, D. O. (2015). An initial investigation into the ecology of culturable aerobic postmortem bacteria. *Science & Justice*, 55(6), 394–401.
- Chunxiang, Q., Jianyun, W., Ruixing, W., & Liang, C. (2009). Corrosion protection of cement-based building materials by surface deposition of CaCO₃ by *Bacillus pasteurii*. *Materials Science and Engineering C*, 29(4), 1273–1280. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2008.10.025>
- Claesson, M. J., Wang, Q., O’Sullivan, O., Greene-Diniz, R., Cole, J. R., Ross, R. P., & O’Toole, P. W. (2010). Comparison of two next-generation sequencing technologies for resolving highly complex microbiota composition using tandem variable 16S rRNA gene regions. *Nucleic Acids Research*, 38(22). <https://doi.org/10.1093/nar/gkq873>
- Cody, G. D., Gupta, N. S., Briggs, D. E. G., Kilcoyne, A. L. D., Summons, R. E., Kenig, F., Plotnick, R. E., & Scott, A. C. (2011). Molecular signature of chitin-protein complex in Paleozoic arthropods. *Geology*, 39(3), 255–258. <https://doi.org/10.1130/G31648.1>
- Coleman, M. L., & Raiswell, R. (1993). Microbial mineralization of organic matter: mechanisms of self- organization and inferred rates of precipitation of diagenetic minerals. *Philosophical Transactions - Royal Society of London, A*, 344(1670), 69–87. <https://doi.org/10.1098/rsta.1993.0076>
- Costerton, J. W., Irvin, R. T., & Cheng, K. J. (1981). The bacterial glycocalyx in nature and disease. *Annual Review of Microbiology*, 35(February 1981), 299–324. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.35.100181.001503>
- Creed, R. P., & Reed, J. M. (2004). Ecosystem engineering by crayfish in a headwater stream community. *Journal of the North American Benthological Society*, 23(2), 224–236. [https://doi.org/10.1899/0887-3593\(2004\)023<0224:EEBCIA>2.0.CO;2](https://doi.org/10.1899/0887-3593(2004)023<0224:EEBCIA>2.0.CO;2)
- Crippen, T. L., Benbow, M. E., & Pechal, J. L. (2015). Microbial interactions during carrion decomposition. *Carrion Ecology, Evolution, and Their Applications*, 31–64. CRC Press. <https://doi.org/10.1201/b18819>
- D’Amico, S., Claverie, P., Collins, T., Georlette, D., Gratia, E., Hoyoux, A., Meuwis, M. A., Feller, G., Gerday, C., Marahiel, M. A., Russell, R., Warren, G., & Davies, P. L. (2002). Molecular basis of cold adaptation. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 357(1423), 917–925. <https://doi.org/10.1098/rstb.2002.1105>
- Dang, H., & Lovell, C. R. (2016). Microbial surface colonization and biofilm development in marine environments. *International Journal of Entrepreneurial Behaviour & Research*, 80(1), 91–138. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00037-15.Address>
- Dapa, T., Leuzzi, R., Ng, Y. K., Baban, S. T., Adamo, R., Kuehne, S. A., Scarselli, M., Minton, N. P., Serruto, D., & Unnikrishnan, M. (2013). Multiple factors modulate biofilm formation by the anaerobic pathogen *Clostridium difficile*. *Journal of Bacteriology*, 195(3), 545–555. <https://doi.org/10.1128/JB.01980-12>
- Darroch, S. A. F., Laflamme, M., Schiffbauer, J. D., & Briggs, D. E. G. (2012). Experimental formation of a microbial death mask. *Palaios*, 27(5), 293–303. <https://doi.org/10.2110/palo.2011.p11-059r>
- Daskalakis, M. I., Magoulas, A., Kotoulas, G., Catsikis, I., Bakolas, A., Karageorgis, A. P., Mavridou, A., Doulia, D., & Rigas, F. (2013). *Pseudomonas*, *Pantoea* and *Cupriavidus* isolates induce calcium carbonate precipitation for bioremediation of ornamental stone. *Journal of Applied Microbiology*, 115(2), 409–423. <https://doi.org/10.1111/jam.12234>
- De Vos, P., Garrity, G., Jones, D., Krieg, N. R., Ludwig, W., Rainey, F. A., Schleifer, K.-H., & Whitman, W. B. (2011). Bergey’s manual of systematic bacteriology: Volume 3: The Firmicutes. *Springer Science & Business Media*.
- DeBruyn, J. M., & Hauther, K. A. (2017). Postmortem succession of gut microbial communities in deceased human subjects. *PeerJ*, 2017(6), 1–14. <https://doi.org/10.7717/peerj.3437>

- Decho, A. W. (2000). Exopolymer microdomains as a structuring agent for heterogeneity within microbial biofilms. *Microbial Sediments*, 9–15. https://doi.org/10.1007/978-3-662-04036-2_2
- Decho, A. W., Visscher, P. T., & Reid, R. P. (2005). Production and cycling of natural microbial exopolymers (EPS) within a marine stromatolite. In *Geobiology: Objectives, Concepts, Perspectives*, 71–86. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52019-7.50008-5>
- Demarchi, B., Hall, S., Roncal-Herrero, T., Freeman, C. L., Woolley, J., Crisp, M. K., Wilson, J., Fotakis, A., Fischer, R., Kessler, B. M., Jersie-Christensen, R. R., Olsen, J. V., Haile, J., Thomas, J., Mearns, C. W., et al. (2016). Protein sequences bound to mineral surfaces persist into deep time. *eLife*, 5, <https://doi.org/10.7554/eLife.17092>
- DeSantis, T. Z., Hugenholtz, P., Larsen, N., Rojas, M., Brodie, E. L., Keller, K., Huber, T., Dalevi, D., Hu, P., & Andersen, G. L. (2006). Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(7), 5069–5072. <https://doi.org/10.1128/AEM.03006-05>
- Dewhurst, F. E., Klein, E. A., Bennett, M. L., Croft, J. M., Harris, S. J., & Marshall-Jones, Z. V. (2015). The feline oral microbiome: A provisional 16S rRNA gene based taxonomy with full-length reference sequences. *Veterinary Microbiology*, 175(2–4), 294–303. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.11.019>
- Dhami, N. K., Reddy, M. S., & Mukherjee, A. (2013a). *Bacillus megaterium* mediated mineralization of calcium carbonate as biogenic surface treatment of green building materials. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 29(12), 2397–2406. <https://doi.org/10.1007/s11274-013-1408-z>
- Dhami, N. K., Reddy, M. S., & Mukherjee, A. (2013b). Biomineralization of calcium carbonate polymorphs by the bacterial strains isolated from calcareous sites. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23(5), 707–714.
- Dickson, G. C., Poulter, R. T. M., Maas, E. W., Probert, P. K., & Kieser, J. A. (2011). Marine bacterial succession as a potential indicator of postmortem submersion interval. *Forensic Science International*, 209(1–3), 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2010.10.016>
- Djokic, T., Van Kranendonk, M. J., Campbell, K. A., Walter, M. R., & Ward, C. R. (2017). Earliest signs of life on land preserved in ca. 3.5 Ga hot spring deposits. *Nature Communications*, 8(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/ncomms15263>
- Douglas, G. M., Maffei, V. J., Zaneveld, J. R., Yurgel, S. N., Brown, J. R., Taylor, C. M., Huttenhower, C., & Langille, M. G. I. (2020). PICRUSt2 for prediction of metagenome functions. *Nature Biotechnology*, 38(6), 685–688. <https://doi.org/10.1038/s41587-020-0548-6>
- Droser, M. L., Gehling, J. G., & Jensen, S. R. (2006). Assemblage palaeoecology of the Ediacara biota: The unabridged edition? *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 232(2–4), 131–147. <https://doi.org/10.1016/j.palaeo.2005.12.015>
- Duda, J. P., Van Kranendonk, M. J., Thiel, V., Ionescu, D., Strauss, H., Schäfer, N., & Reitner, J. (2016). A rare glimpse of paleoarchean life: Geobiology of an exceptionally preserved microbial mat facies from the 3.4 Ga strelley pool formation, Western Australia. *PLoS ONE*, 11(1), 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0147629>
- Dunn, K. A., McLean, R. J. C., Upchurch, G. R., & Folk, R. L. (1997). Enhancement of leaf fossilization potential by bacterial biofilms. *Geology*, 25(12), 1119–1122. [https://doi.org/10.1130/0091-7613\(1997\)025<1119:EOLFPB>2.3.CO;2](https://doi.org/10.1130/0091-7613(1997)025<1119:EOLFPB>2.3.CO;2)
- Dunne, W. M. (2002). Bacterial adhesion: Seen any good biofilms lately? *Clinical Microbiology Reviews*, 15(2), 155–166. <https://doi.org/10.1128/CMR.15.2.155-166.2002>

- Dupraz, C., Reid, R. P., Braissant, O., Decho, A. W., Norman, R. S., & Visscher, P. T. (2009). Processes of carbonate precipitation in modern microbial mats. *Earth-Science Reviews*, *96*(3), 141–162. <https://doi.org/10.1016/j.earscirev.2008.10.005>
- Dupraz, C., & Visscher, P. T. (2005). Microbial lithification in marine stromatolites and hypersaline mats. *Trends in Microbiology*, *13*(9), 429–438. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2005.07.008>
- Durán, N., Justo, G. Z., Ferreira, C. V., Melo, P. S., Cordi, L., & Martins, D. (2007). Violacein: properties and biological activities. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, *48*(3), 127. <https://doi.org/10.1042/ba20070115>
- Eagan, J. L., Andrews, M. E., Pearson, R. L., Turner, F. R., Raff, E. C., & Raff, R. A. (2017). Identification and modes of action of endogenous bacteria in taphonomy of embryos and larvae. *Palaios*, *32*(4), 206–217. <https://doi.org/10.2110/palo.2016.071>
- Ellis, A. E. (1991). An appraisal of the extracellular toxins of *Aeromonas salmonicida* ssp. *salmonicida*. *Journal of Fish Diseases*, *14*(3), 265–277. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.1991.tb00824.x>
- Faivre, D., & Schüler, D. (2008). Magnetotactic bacteria and magnetosomes. *Chemical Reviews*, *108*(11), 4875–4898. <https://doi.org/10.1021/cr078258w>
- Farell, E. M., & Alexandre, G. (2012). Bovine serum albumin further enhances the effects of organic solvents on increased yield of polymerase chain reaction of GC-rich templates. *BMC Research Notes*, *5*(1), 1. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-5-257>
- Farrell, Ú. C., Briggs, D. E. G., Hammarlund, E. U., Sperling, E. A., & Gaines, R. R. (2013). Paleoredox and pyritization of soft-bodied fossils in the ordovician frankfort shale of New York. *American Journal of Science*, *313*(5), 452–489. <https://doi.org/10.2475/05.2013.02>
- Farrell, Ú. C. (2014). Pyritization of soft tissues in the fossil record: An overview. *The Paleontological Society Papers*, *20*, 35–58. <https://doi.org/10.1017/s1089332600002795>
- Ferrari, G., Lischer, H. E. L., Neukamm, J., Rayo, E., Borel, N., Pospischil, A., Rühli, F., Bouwman, A. S., & Campana, M. G. (2018). Assessing metagenomic signals recovered from Lyuba, a 42,000-year-old permafrost-preserved woolly mammoth calf. *Genes*, *9*(9), 1–17. <https://doi.org/10.3390/genes9090436>
- Ferrer, M. R., Quevedo-Sarmiento, J., Rivadeneyra, M. A., Bejar, V., Delgado, R., & Ramos-Cormenzana, A. (1988). Calcium carbonate precipitation by two groups of moderately halophilic microorganisms at different temperatures and salt concentrations. *Current Microbiology*, *17*(4), 221–227. <https://doi.org/10.1007/BF01589456>
- Flemming, H. C., & Wingender, J. (2010). The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology*, *8*(9), 623–633. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2415>
- Flores-Díaz, M., & Alape-Girón, A. (2003). Role of *Clostridium perfringens* phospholipase C in the pathogenesis of gas gangrene. *Toxicon*, *42*(8), 979–986. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2003.11.013>
- Flores-Mireles, A. L., Walker, J. N., Caparon, M., & Hultgren, S. J. (2015). Urinary tract infections: Epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. *Nature Reviews Microbiology*, *13*(5), 269–284. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3432>
- Fouhy, F., Clooney, A. G., Stanton, C., Claesson, M. J., & Cotter, P. D. (2016). 16S rRNA gene sequencing of mock microbial populations-impact of DNA extraction method, primer choice and sequencing platform. *BMC Microbiology*, *16*(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s12866-016-0738-z>
- Fourie, J. C. J., Bezuidenhout, C. C., Sanko, T. J., Mienie, C., & Adeleke, R. (2020). Inside environmental *Clostridium perfringens* genomes: antibiotic resistance genes, virulence factors and genomic features. *Journal of Water and Health*, *18*(4), 477–493. <https://doi.org/10.2166/wh.2020.029>

- Freeman, C., Chapman, P. J., Gilman, K., Lock, M. A., Reynolds, B., & Wheeler, H. S. (1995). Ion exchange mechanisms and the entrapment of nutrients by river biofilms. *Hydrobiologia*, 297(1), 61–65. <https://doi.org/10.1007/BF00033502>
- Freese, H. M., & Schink, B. (2011). Composition and stability of the microbial community inside the digestive tract of the aquatic crustacean *Daphnia magna*. *Microbial Ecology*, 62(4), 882–894. <https://doi.org/10.1007/s00248-011-9886-8>
- Freytet, P., & Verrecchia, E. P. (1998). Freshwater organisms that build stromatolites: a synopsis of biocrystallization by prokaryotic and eukaryotic algae. *Sedimentology*, 45(3), 535–563. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3091.1998.00155.x>
- Fu, X., Zeng, B., Wang, P., Wang, L., Wen, B., Li, Y., Liu, H., Bai, S., & Jia, G. (2018). Microbiome of total versus live bacteria in the gut of rex rabbits. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1–10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00733>
- Funari, R., Ripa, R., Söderström, B., Skoglund, U., & Shen, A. Q. (2019). Detecting gold biomineralization by *Delftia acidovorans* biofilms on a quartz crystal microbalance. *ACS Sensors*, 4(11), 3023–3033. <https://doi.org/10.1021/acssensors.9b01580>
- Gäb, F., Ballhaus, C., Stinnesbeck, E., Kral, A. G., Janssen, K., & Bierbaum, G. (2020). Experimental taphonomy of fish - role of elevated pressure, salinity and pH. *Scientific Reports*, 10(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-64651-8>
- Gaboyer, F., Le Milbeau, C., Bohmeier, M., Schwendner, P., Vannier, P., Beblo-Vranesevic, K., Rabbow, E., Foucher, F., Gautret, P., Guégan, R., Richard, A., Sauldubois, A., Richmann, P., Perras, A. K., Moissl-Eichinger, C., et al. (2017). Mineralization and preservation of an extremotolerant bacterium isolated from an early Mars analog environment. *Scientific Reports*, 7(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-08929-4>
- Gaines, R. R., Kennedy, M. J., & Droser, M. L. (2005). A new hypothesis for organic preservation of Burgess Shale taxa in the middle Cambrian Wheeler Formation, House Range, Utah. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 220(1–2), 193–205. <https://doi.org/10.1016/j.palaeo.2004.07.034>
- Gall, J. C. (2001). Role of Microbial Mats. In *Palaeobiology II*, 280–284.
- García, M. G., Pérez-Córceles, M. D., Osuna, E., & Legaz, I. (2020). Impact of the human microbiome in forensic sciences: a systematic review. *Applied and Environmental Microbiology*, 86(22), 1–20. <https://doi.org/10.1128/AEM.01451-20>
- Gehling, J. G. (1999). Microbial mats in terminal Proterozoic siliciclastics: Ediacaran death masks. *Palaios*, 14(1), 40–57. <https://doi.org/10.2307/3515360>
- Gehling, J. G., Droser, M. L., Jensen, S. R., Runnegar, B. N., & Briggs, D. E. G. (2005). Ediacara organisms: relating form to function. *Evolving Form and Function: Fossils and Development*, 43–66.
- Gerardi, M. H. (2006). Wastewater Bacteria (Vol. 5). In *Wastewater Microbiology Series*. John Wiley & Sons. <https://doi.org/10.1109/TLA.2016.7786313>
- Gerday, C. (2013). Psychrophily and catalysis. *Biology*, 2(2), 719–741. <https://doi.org/10.3390/biology2020719>
- Gibbons, N. E., & Reed, G. B. (1930). The effect of autolysis in sterile tissues on subsequent bacterial decomposition. *Journal of Bacteriology*, 19(2), 73–88.
- Giuffrè, A. J., Hamm, L. M., Han, N., De Yoreo, J. J., & Dove, P. M. (2013). Polysaccharide chemistry regulates kinetics of calcite nucleation through competition of interfacial energies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(23), 9261–9266. <https://doi.org/10.1073/pnas.1222162110>

- Gläser, S. P., Bolte, K., Martin, K., Busse, H. J., Grossart, H. P., Kämpfer, P., & Glaeser, J. (2013). *Novosphingobium fuchskuhlense* sp. nov., isolated from the north-east basin of Lake Grosse Fuchskuhle. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63(PART2), 586–592. <https://doi.org/10.1099/ij.s.0.043083-0>
- Glassing, A., Dowd, S. E., Galandiuk, S., Davis, B., & Chiodini, R. J. (2016). Inherent bacterial DNA contamination of extraction and sequencing reagents may affect interpretation of microbiota in low bacterial biomass samples. *Gut Pathogens*, 8(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s13099-016-0103-7>
- Gorbach, S. L., & Thadepalli, H. (1975). Isolation of *Clostridium* in human infections: evaluation of 114 cases. *Journal of Infectious Diseases*, 131, 81–85. <https://doi.org/10.1093/infdis/131.supplement.s81>
- Gostling, N. J., Thomas, C. W., Greenwood, J. M., Dong, X., Bengtson, S., Raff, E. C., Raff, R. A., Degnan, B. M., Stampanoni, M., & Donoghue, P. C. J. (2008). Deciphering the fossil record of early bilaterian embryonic development in light of experimental taphonomy. *Evolution and Development*, 10(3), 339–349. <https://doi.org/10.1111/j.1525-142X.2008.00242.x>
- Gostling, N. J., Dong, X., & Donoghue, P. C. J. (2009). Ontogeny and taphonomy: An experimental taphonomy study of the development of the brine shrimp *Artemia salina*. *Palaeontology*, 52(1), 169–186. <https://doi.org/10.1111/j.1475-4983.2008.00834.x>
- Graham, L. E., Knack, J. J., Piotrowski, M. J., Wilcox, L. W., Cook, M. E., Wellman, C. H., Taylor, W., Lewis, L. A., & Arancibia-Avila, P. (2014). Lacustrine *Nostoc* (Nostocales) and associated microbiome generate a new type of modern clotted microbialite. *Journal of Phycology*, 50(2), 280–291. <https://doi.org/10.1111/jpy.12152>
- Grahn, N., Olofsson, M., Ellnebo-Svedlund, K., Monstein, H. J., & Jonasson, J. (2003). Identification of mixed bacterial DNA contamination in broad-range PCR amplification of 16S rDNA V1 and V3 variable regions by pyrosequencing of cloned amplicons. *FEMS Microbiology Letters*, 219(1), 87–91. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(02\)01190-4](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(02)01190-4)
- Grazhdankin, D., & Gerdes, G. (2007). Ediacaran microbial colonies. *Lethaia*, 40(3), 201–210. <https://doi.org/10.1111/j.1502-3931.2007.00025.x>
- Grey, K., Moore, L. S., Burne, R. V., Piersorp, B. K., & Bauld, J. (1990). Lake Thetis, Western Australia: An example of saline lake sedimentation dominated by benthic microbial processes. *Marine and Freshwater Research*, 41(2), 275–300. <https://doi.org/10.1071/MF9900275>
- Guan, C., Wang, W., Zhou, C., Muscente, A. D., Wan, B., Chen, X., Yuan, X., Chen, Z., & Ouyang, Q. (2017). Controls on fossil pyritization: Redox conditions, sedimentary organic matter content, and Chuaria preservation in the Ediacaran Lantian Biota. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 474, 26–35.
- Guerrero, M. C., & de Wit, R. (1992). Microbial mats in the inland saline lakes of Spain. *Limnetica*, 8, 197–204.
- Guerrieri, E., Bondi, M., Sabia, C., de Niederhäusern, S., Borella, P., & Messi, P. (2008). Effect of bacterial interference on biofilm development by *Legionella pneumophila*. *Current Microbiology*, 57(6), 532–536. <https://doi.org/10.1007/s00284-008-9237-2>
- Gunnlaugsdóttir, B., & Gudmundsdóttir, B. K. (1997). Pathogenicity of atypical *Aeromonas salmonicida* in Atlantic salmon compared with protease production. *Journal of Applied Microbiology*, 83(5), 542–551. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1997.00247.x>
- Guo, J., Fu, X., Liao, H., Hu, Z., Long, L., Yan, W., Ding, Y., Zha, L., Guo, Y., Yan, J., Chang, Y., & Cai, J. (2016). Potential use of bacterial community succession for estimating post-mortem interval as revealed by high-throughput sequencing. *Scientific Reports*, 6(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/srep24197>
- Gupta, N. S., Collinson, M. E., Briggs, D. E. G., Evershed, R. P., & Pancost, R. D. (2006). Reinvestigation of the occurrence of cutan in plants: implications for the leaf fossil record. *Paleobiology*, 32(3), 432–449. <https://doi.org/10.1666/05038.1>

- Haagsma, J. (1991). Pathogenic anaerobic bacteria and the environment. *Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)*, 10(3), 749–764. <https://doi.org/10.20506/rst.10.3.569>
- Habraken, W. J. E. M., Tao, J., Brylka, L. J., Friedrich, H., Bertinetti, L., Schenk, A. S., Verch, A., Dmitrovic, V., Bomans, P. H. H., Frederik, P. M., Laven, J., Van Der Schoot, P., Aichmayer, B., De With, G., DeYoreo, J. J., & Sommerdijk, N. A. J. M. (2013). Ion-association complexes unite classical and non-classical theories for the biomimetic nucleation of calcium phosphate. *Nature Communications*, 4(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/ncomms2490>
- Hammes, F., & Verstraete, W. (2002). Key roles of pH and calcium metabolism in microbial carbonate precipitation. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 1(1), 3–7. <https://doi.org/10.1023/A:1015135629155>
- Hammes, F., Boon, N., De Villiers, J., Verstraete, W., & Siciliano, S. D. (2003). Strain-specific ureolytic microbial calcium carbonate precipitation. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(8), 4901–4909. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.8.4901-4909.2003>
- Hancy, A. D., & Antcliffe, J. B. (2020). Anoxia can increase the rate of decay for cnidarian tissue: Using *Actinia equina* to understand the early fossil record. *Geobiology*, 18(2), 167–184. <https://doi.org/10.1111/gbi.12370>
- Hartley, A. M., House, W. A., Leadbeater, B. S. C., & Callow, M. E. (1996). The use of microelectrodes to study the precipitation of calcite upon algal biofilms. *Journal of Colloid and Interface Science*, 183(2), 498–505. <https://doi.org/10.1006/jcis.1996.0573>
- Hatamoto, M., Imachi, H., Yashiro, Y., Ohashi, A., & Harada, H. (2007). Diversity of anaerobic microorganisms involved in long-chain fatty acid degradation in methanogenic sludges as revealed by RNA-based stable isotope probing. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(13), 4119–4127. <https://doi.org/10.1128/AEM.00362-07>
- Hatayama, K., & Saito, K. (2019). Calcite formation induced by *Ensifer adhaerens*, *Microbacterium testaceum*, *Paeniglutamicibacter kerguelensis*, *Pseudomonas protegens* and *Rheinheimera texasensis*. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 112(5), 711–721. <https://doi.org/10.1007/s10482-018-1204-8>
- Heinemann, S., Heinemann, C., Jäger, M., Neunzehn, J., Wiesmann, H. P., & Hanke, T. (2011). Effect of silica and hydroxyapatite mineralization on the mechanical properties and the biocompatibility of nanocomposite collagen scaffolds. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 3(11), 4323–4331. <https://doi.org/10.1021/am200993q>
- Hickman-Lewis, K., Cavalazzi, B., Foucher, F., & Westall, F. (2018). Most ancient evidence for life in the Barberton greenstone belt: Microbial mats and biofabrics of the ~3.47 Ga Middle Marker horizon. *Precambrian Research*, 312, 45–67. <https://doi.org/10.1016/j.precamres.2018.04.007>
- Hilal, M. G., Yu, Q., Zhou, R., Wang, Y., Feng, T., Li, X., & Li, H. (2021). Exploring microbial communities, assessment methodologies and applications of animal’s carcass decomposition: a review. *FEMS Microbiology Ecology*, 97(8), 1–13.
- Hippler, D., Hu, N., Steiner, M., Scholtz, G., & Franz, G. (2011). Experimental mineralization of crustacean eggs leads to surprising tissue conservation: new implications for the fossilization of Precambrian-Cambrian embryos. *Biogeosciences Discussions*, 8(6), 12051–12077. <https://doi.org/10.5194/bgd-8-12051-2011>
- Hirvela-Koski, V., Koski, P., & Niiranen, H. (1994). Biochemical properties and drug resistance of *Aeromonas salmonicida* in Finland. *Diseases of Aquatic Organisms*, 20(3), 191–196. <https://doi.org/10.3354/dao020191>
- Hoel, S., Vadstein, O., & Jakobsen, A. N. (2018). Growth of mesophilic *Aeromonas salmonicida* in an experimental model of nigiri sushi during cold storage. *International Journal of Food Microbiology*, 285, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.07.008>
- Hof, C. H. J., & Briggs, D. E. G. (1997). Decay and mineralization of mantis shrimps (Stomatopoda; Crustacea); a key to their fossil record. *Palaios*, 12(5), 420–438.

- Holt, C. C., Giezen, M. Van Der, Daniels, C. L., Stentiford, G. D., & Bass, D. (2020). Spatial and temporal axes impact ecology of the gut microbiome in juvenile European lobster (*Homarus gammarus*). *The ISME Journal*, *14*(2), 531–543. <https://doi.org/10.1038/s41396-019-0546-1>
- Homann, M., Sansjofre, P., Van Zuilen, M., Heubeck, C., Gong, J., Killingsworth, B., Foster, I. S., Airo, A., Van Kranendonk, M. J., Ader, M., & Lalonde, S. V. (2018). Microbial life and biogeochemical cycling on land 3,220 million years ago. *Nature Geoscience*, *11*(9), 665–671. <https://doi.org/10.1038/s41561-018-0190-9>
- Hou, D., Huang, Z., Zeng, S., Liu, J., Weng, S., & He, J. (2018). Comparative analysis of the bacterial community compositions of the shrimp intestine, surrounding water and sediment. *Journal of Applied Microbiology*, *125*(3), 792–799. <https://doi.org/10.1111/jam.13919>
- Hu, H., Rodrigues da Costa, R., Pilgaard, B., Schiøtt, M., Lange, L., & Poulsen, M. (2018). The origin of fungi-culture in termites was associated with a shift to a mycolytic gut bacteria community. In *BioRxiv*, 440172. <https://doi.org/10.1101/440172>
- Huang, Z., Li, X., Wang, L., & Shao, Z. (2016). Changes in the intestinal bacterial community during the growth of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture Research*, *47*(6), 1737–1746. <https://doi.org/10.1111/are.12628>
- Hudson, J. A., & Mott, S. J. (1993). Growth of *Listeria monocytogenes*, *Aeromonas hydrophila* and *Yersinia enterocolitica* on cold-smoked salmon under refrigeration and mild temperature abuse. *Food Microbiology*, *10*(1), 61–68. <https://doi.org/10.1006/fmic.1993.1006>
- Hughes, R., Alkan, Z., Keim, N. L., & Kable, M. E. (2017). Impact of sequence variant detection and bacterial DNA extraction methods on the measurement of microbial community composition in human stool. *BioRxiv*, 212134. <https://doi.org/https://doi.org/10.1101/212134>
- Huson, D. H., Steel, M., El-Hadidi, M., Mitra, S., Peter, S., & Willmann, M. (2017). A simple statistical test of taxonomic or functional homogeneity using replicated microbiome sequencing samples. *Journal of Biotechnology*, *250*, 45–50. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.10.020>
- Huys, G., Coopman, V., Van Varenbergh, D., & Cordonnier, J. (2012). Selective culturing and genus-specific PCR detection for identification of *Aeromonas* in tissue samples to assist the medico-legal diagnosis of death by drowning. *Forensic Science International*, *221*(1–3), 11–15. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2012.03.017>
- Hyde, E. R., Haarmann, D. P., Lynne, A. M., Bucheli, S. R., & Petrosino, J. F. (2013). The living dead: bacterial community structure of a cadaver at the onset and end of the bloat stage of decomposition. *PLoS ONE*, *8*(10), e77733. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0077733>
- Hyde, E. R., Metcalf, J. L., Bucheli, S. R., Lynne, A. M., & Knight, R. (2017). Microbial communities associated with decomposing corpses. In *Forensic Microbiology*, Carter, D. O., Tomberlin, J. K., Benbow, M. E., & Metcalf, J. L. (Eds.). John Wiley & Sons.
- Iniesto, M., Lopez-Archilla, A. I., Fregenal-Martínez, M., Buscalioni, A. D., & Carmen Guerrero, M. (2013). Involvement of microbial mats in delayed decay: An experimental essay on fish preservation. In *Palaios*, *28*(1), 56–66. <https://doi.org/10.2110/palo.2011.p11-099r>
- Iniesto, M., Zeyen, N., López-Archilla, A. I., Bernard, S., Buscalioni, Á. D., Guerrero, M. C., & Benzerara, K. (2015a). Preservation in microbial mats: Mineralization by a talc-like phase of a fish embedded in a microbial sarcophagus. *Frontiers in Earth Science*, *3*, 51. <https://doi.org/10.3389/feart.2015.00051>
- Iniesto, M., C., Florín, M., Carmen Guerrero, M., Chicote, A., Buscalioni, A. D., & López-Archilla, A. I. (2015b). The impact of microbial mats and their microenvironmental conditions in early decay of fish. *Palaios*, *30*(11), 792–801. <https://doi.org/10.2110/palo.2014.086>

- Iniesto, M., Buscalioni, Á. D., Carmen Guerrero, M., Benzerara, K., Moreira, D., & López-Archilla, A. I. (2016). Involvement of microbial mats in early fossilization by decay delay and formation of impressions and replicas of vertebrates and invertebrates. *Scientific Reports*, 6(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/srep25716>
- Iniesto, M., Villalba, I., Buscalioni, A. D., Guerrero, M. C., & López-Archilla, A. I. (2017). The effect of microbial mats in the decay of anurans with implications for understanding taphonomic processes in the fossil record. *Scientific Reports*, 7(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/srep45160>
- Iniesto, M., Blanco-Moreno, C., Villalba, A., Buscalioni, Á. D., Guerrero, M. C., & López-Archilla, A. I. (2018). Plant tissue decay in long-term experiments with microbial mats. *Geosciences (Switzerland)*, 8(11). <https://doi.org/10.3390/geosciences8110387>
- Inoue, H., Ohira, T., Ozaki, N., & Nagasawa, H. (2004). A novel calcium-binding peptide from the cuticle of the crayfish, *Procambarus clarkii*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 318(3), 649–654. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.04.075>
- Ioan, B. G., Manea, C., Hanganu, B., Statescu, L., Solovastu, L. G., & Manoilescu, I. (2017). The chemistry decomposition in human corpses. *Revista de Chimie*, 68(6), 1450–1454. <https://doi.org/10.37358/rc.17.6.5672>
- Ionescu, D., Spitzer, S., Reimer, A., Schneider, D., Daniel, R., Reitner, J., de Beer, D., & Arp, G. (2015). Calcium dynamics in microbialite-forming exopolymer-rich mats on the atoll of Kiritimati, Republic of Kiribati, Central Pacific. *Geobiology*, 13(2), 170–180. <https://doi.org/10.1111/gbi.12120>
- Jaeger, K. E., Ransac, S., Dijkstra, B. W., Colson, C., van Heuvel, M., & Misset, O. (1994). Bacterial lipases. *FEMS Microbiology Reviews*, 15(1), 29–63. [https://doi.org/10.1016/0168-6445\(94\)90025-6](https://doi.org/10.1016/0168-6445(94)90025-6)
- Jagmann, N., Von Rekowski, K. S., & Philipp, B. (2012). Interactions of bacteria with different mechanisms for chitin degradation result in the formation of a mixed-species biofilm. *FEMS Microbiology Letters*, 326(1), 69–75. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2011.02435.x>
- Janaway, R. C., Percival, S. L., & Wilson, A. S. (2009). Decomposition of human remains. In *Microbiology and aging*, 313–334. Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-327-1_14
- Janssen, K., Low, S. L., Wang, Y., Mu, Q., Bierbaum, G., & Gee, C. T. (2021). Elucidating biofilm diversity on water lily leaves through 16S rRNA amplicon analysis: Comparison of four DNA extraction kits. *Applications in Plant Sciences*, July, 1–15. <https://doi.org/10.1002/aps3.11444>
- Jauvion, C., Bernard, S., Gueriau, P., Mocuta, C., Pont, S., Benzerara, K., & Charbonnier, S. (2020). Exceptional preservation requires fast biodegradation: thylacocephalan specimens from La Voulte-sur-Rhône (Calloviaian, Jurassic, France). *Palaeontology*, 63(3), 395–413. <https://doi.org/10.1111/pala.12456>
- Jin, Y., & Yip, H.-K. (2002). Supragingival calculus: Formation and control. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, 13(5), 426–441. <https://doi.org/10.1177/154411130201300506>
- Jiravanichpaisal, P., Roos, S., Edsman, L., Liu, H., & Söderhäll, K. (2009). A highly virulent pathogen, *Aeromonas hydrophila*, from the freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 101(1), 56–66. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2009.02.002>
- Johnson, J. S., Spakowicz, D. J., Hong, B. Y., Petersen, L. M., Demkowicz, P., Chen, L., Leopold, S. R., Hanson, B. M., Agresta, H. O., Gerstein, M., Sodergren, E., & Weinstock, G. M. (2019). Evaluation of 16S rRNA gene sequencing for species and strain-level microbiome analysis. *Nature Communications*, 10(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13036-1>
- Jones, B., Konhauser, K. O., Renaut, R. W., & Wheeler, R. S. (2004). Microbial silicification in Iodine Pool, Waimangu geothermal area, North Island, New Zealand: Implications for recognition and identification of ancient silicified microbes. *Journal of the Geological Society*, 161(6), 983–993. <https://doi.org/10.1144/0016-764903-172>

- Jones, B. V., Sun, F., & Marchesi, J. R. (2007). Using skimmed milk agar to functionally screen a gut metagenomic library for proteases may lead to false positives. *Letters in Applied Microbiology*, 45(4), 418–420. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2007.02202.x>
- Junkins, E. N., Hye, E. R. & Carter, D. O. (2017). Culture and long - term storage of microorganisms for forensic science. In *Forensic Microbiology*, Carter, D. O., Tomberlin, J. K., Benbow, M. E., & Metcalf, J. L. (Eds.). John Wiley & Sons.
- Kappler, A., Schink, B., & Newman, D. K. (2005). Fe(III) mineral formation and cell encrustation by the nitrate-dependent Fe(II)-oxidizer strain BoFeN1. *Geobiology*, 3(4), 235–245. <https://doi.org/10.1111/j.1472-4669.2006.00056.x>
- Kear, A. J., Briggs, D. E. G., & Donovan, D. T. (1995). Decay and fossilization of non-mineralized tissue in coleoid cephalopods. *Palaeontology*, 38(1), 105–132.
- Kembel, S. W., Wu, M., Eisen, J. A., & Green, J. L. (2012). Incorporating 16S gene copy number information improves estimates of microbial diversity and abundance. *PLoS Computational Biology*, 8(10), 16–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1002743>
- Kenchington, C. G., Wilby, P. R., & Street, D. (2015). Of Time and Taphonomy: Preservation in the Ediacaran. *Reading and Writing of the Fossil Record: Preservation Pathways to Exceptional Preservation*, 100–122.
- Kharlamova, A., Saveliev, S., Kurtova, A., Chernikov, V., Protopopov, A., Boeskorov, G., Plotnikov, V., Ushakov, V., & Maschenko, E. (2016). Preserved brain of the woolly mammoth (*Mammuthus primigenius* (Blumenbach 1799)) from the Yakutian permafrost. *Quaternary International*, 406, 86–93. <https://doi.org/10.1016/j.quaint.2014.09.073>
- Kidwell, S. M., & Baumiller, T. (1990). Experimental disintegration of regular echinoids: Roles of temperature, oxygen and decay thresholds. *Paleontology*, 16(3), 247–271. <https://doi.org/10.1017/S0094837300009982>
- Kim, M., Morrison, M., & Yu, Z. (2011). Evaluation of different partial 16S rRNA gene sequence regions for phylogenetic analysis of microbiomes. *Journal of Microbiological Methods*, 84(1), 81–87. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2010.10.020>
- Klatt, C. G., Inskeep, W. P., Herrgard, M. J., Jay, Z. J., Rusch, D. B., Tringe, S. G., Parenteau, M. N., Ward, D. M., Boomer, S. M., Bryant, D. A., & Miller, S. R. (2013). Community structure and function of high-temperature chlorophototrophic microbial mats inhabiting diverse geothermal environments. *Frontiers in Microbiology*, 4, 1–23. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00106>
- Knøchel, S. (1990). Growth characteristics of motile *Aeromonas* spp. isolated from different environments. *International Journal of Food Microbiology*, 10(3–4), 235–244. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(90\)90071-C](https://doi.org/10.1016/0168-1605(90)90071-C)
- Kolde, R. (2019). pheatmap: Pretty Heatmaps. R package version 1.0.12. <https://CRAN.R-project.org/package=pheatmap>
- Königswald, von W. & Storch, G. (Hrsg.) (1998). Messel, Ein Pompeji der Paläontologie. Species 2. Stuttgart, Deutschland: Jan Thorbecke Verlag
- Kostanjšek, R., Štrus, J., & Avguštin, G. (2007). “Candidatus Bacilloplasma”, a novel lineage of Mollicutes associated with the hindgut wall of the terrestrial Isopod *Porcellio scaber* (Crustacea : Isopoda). *Applied and Environmental Microbiology*, 73(17), 5566–5573. <https://doi.org/10.1128/AEM.02468-06>
- Kouker, G., & Jaeger, K. E. (1987). Specific and sensitive plate assay for bacterial lipases. *Applied and Environmental Microbiology*, 53(1), 211–213. <https://doi.org/10.1128/aem.53.1.211-213.1987>

- Kuczynski, J., Lauber, C. L., Walters, W. A., Parfrey, L. W., Clemente, J. C., Gevers, D., & Knight, R. (2012). Experimental and analytical tools for studying the human microbiome. *Nature Reviews Genetics*, *13*(1), 47–58. <https://doi.org/10.1038/nrg3129>
- Kueneman, J. G., Parfrey, L. W., Woodhams, D. C., Archer, H. M., Knight, R., & McKenzie, V. J. (2014). The amphibian skin-associated microbiome across species, space and life history stages. *Molecular ecology*, *23*(6), 1238–1250. <https://doi.org/10.1111/mec.12510>
- Labbe, R. G., & Huang, T. H. (1995). Generation times and modeling of enterotoxin-positive and enterotoxin-negative strains of *Clostridium perfringens* in laboratory media and ground beef. *Journal of Food Protection*, *58*(12), 1303–1306.
- Laflamme, M., Schiffbauer, J. D., Narbonne, G. M., & Briggs, D. E. G. (2011). Microbial biofilms and the preservation of the Ediacara biota. *Lethaia*, *44*(2), 203–213. <https://doi.org/10.1111/j.1502-3931.2010.00235.x>
- Landsman, A., St-Pierre, B., Rosales-Leija, M., Brown, M., & Gibbons, W. (2019). Impact of aquaculture practices on intestinal bacterial profiles of pacific whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Microorganisms*, *7*(93), 1–14. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7040093>
- Lane, D. J., Pace, B., Olsen, G. J., Stahl, D. A., Sogin, M. L., & Pace, N. R. (1985). Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *82*(20), 6955–6959. <https://doi.org/10.1073/pnas.82.20.6955>
- Lane, D. J. (1991). 16S/23S rRNA sequencing. *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*, 115–175.
- Lee, J. Y., Kang, W., Kim, P. S., Lee, S. Y., Shin, N. R., Sung, H., Lee, J. Y., Yun, J. H., Jeong, Y. S., Han, J. E., Jung, M. J., Hyun, D. W., Kim, H. S., Tak, E. J., Kang, M. S., Lee, K. E., Lee, B. H., & Bae, J. W. (2019). *Iodobacter ciconiae* sp. nov., a bacterium isolated from feces of oriental stork, *ciconia boyciana*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *69*(9), 2948–2953. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.003583>
- Li, J., Benzerara, K., Bernard, S., & Beyssac, O. (2013). The link between biomineralization and fossilization of bacteria: Insights from field and experimental studies. *Chemical Geology*, *359*, 49–69. <https://doi.org/10.1016/j.chemgeo.2013.09.013>
- Li, K., Yuan, X. X., Sun, H. M., Zhao, L. S., Tang, R., Chen, Z. H., Qin, Q. L., Chen, X. L., Zhang, Y. Z., & Su, H. N. (2018a). Atomic force microscopy of side wall and septa peptidoglycan from *Bacillus subtilis* reveals an architectural remodeling during growth. *Frontiers in Microbiology*, *9*, 1–6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00620>
- Li, R., Tun, H. M., Jahan, M., Zhang, Z., Kumar, A., Fernando, D., Farenhorst, A., & Khafipour, E. (2017). Comparison of DNA-, PMA-, and RNA-based 16S rRNA Illumina sequencing for detection of live bacteria in water. *Scientific Reports*, *7*(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-02516-3>
- Li, X., Zhu, X., Wang, W., & Ning, K. (2018b). Bacterial contamination screening and interpretation for biological laboratory environments. *BioRxiv*, 439570. <https://doi.org/10.1016/j.medmic.2020.100021>
- Li, X., Yan, Z., & Xu, J. (2003). Quantitative variation of biofilms among strains in natural populations of *Candida albicans*. *Microbiology*, *149*(2), 353–362. <https://doi.org/10.1099/mic.0.25932-0>
- Lian, B., Hu, Q., Chen, J., Ji, J., & Teng, H. H. (2006). Carbonate biomineralization induced by soil bacterium *Bacillus megaterium*. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, *70*(22), 5522–5535. <https://doi.org/10.1016/j.gca.2006.08.044>
- Lin, C. Y., Turchyn, A. V., Steiner, Z., Bots, P., Lampronti, G. I., & Tosca, N. J. (2018). The role of microbial sulfate reduction in calcium carbonate polymorph selection. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, *237*, 184–204. <https://doi.org/10.1016/j.gca.2018.06.019>

- Lin, S., Kong, T., Ren, X., Li, S., & Gong, Y. (2020). Elucidation of gut microbiota in mud crab *Scylla paramamosain* challenged to WSSV and *Aeromonas hydrophila*. *Marine Biotechnology*, 22(5), 661–672. <https://doi.org/10.1007/s10126-020-09987-y>
- Lindahl T. (1993). Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature*, 362(6422), 709–715. <https://doi.org/10.1038/362709a0>
- Liu, R., Wang, Q., Zhang, K., Wang, G., & Yu, K. (2021). Analysis of postmortem intestinal microbiota successional patterns with application in postmortem interval estimation. 1–20. Preprint: <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-411962/v1>
- Lobb, B., Hodgson, R., Lynch, M. D. J., Mansfield, M. J., Cheng, J., Charles, T. C., Neufeld, J. D., Craig, P. M., & Doxey, A. C. (2020). Time series resolution of the fish necrobiome reveals a decomposer succession involving toxigenic bacterial pathogens. *MSystems*, 5(2), 1–15. <https://doi.org/10.1128/msystems.00145-20>
- Logan, N. A., & de Vos, P. (2015). *Bacillus*. In *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. <https://doi.org/10.1002/9781118960608.gbm00530>
- Lowenstam, H. A., & Weiner, S. (1989). *On biomineralization*. Oxford: Oxford University Press on Demand.
- Ma, Z. Y., Zhang, X. M., Wang, R., Wang, M., Liu, T., & Tan, Z. L. (2020). Effects of chemical and mechanical lysis on microbial DNA yield, integrity, and downstream amplicon sequencing of rumen bacteria and Protozoa. *Frontiers in Microbiology*, 11, 1–9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.581227>
- Macrae, A. R., & Hammond, R. C. (1985). Present and future applications of lipases. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 3(1), 193–217. <https://doi.org/10.1080/02648725.1985.10647813>
- Mah, T. F. C., & O'Toole, G. A. (2001). Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends in Microbiology*, 9(1), 34–39. [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(00\)01913-2](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(00)01913-2)
- Mähler, B., Schwermann, A. H., Wutke, M., Schultz, J. A., & Martin, T. (2015). Four-dimensional virtopsy and the taphonomy of a mole from the Oligocene of Lake Enspel (Germany). *Palaeobiodiversity and Palaeoenvironments*, 95(1), 115–131. <https://doi.org/10.1007/s12549-014-0180-x>
- Mähler, B., Janssen, K., Menneken, M., Tahoun, M., Lagos, M., Bierbaum, G., Müller, C. E., & Rust, J. (2020). Calcite precipitation forms crystal clusters and muscle mineralization during the decomposition of *Cambarellus diminutus* (Decapoda: Cambaridae) in freshwater. *Palaeontologia Electronica*, 23(3). <https://doi.org/10.26879/992>
- Mähler, B. (2021) Taphonomic experiments on *Cambarellus diminutus* under different environmental conditions and the influence of bacterial activity with regard to fossilization in freshwater. Dissertation, Rheinische Friedrich-Wilhelms Universität Bonn, Institut für Geowissenschaften, Fachbereich Paläontologie.
- Männistö, M. K., & Häggblom, M. M. (2006). Characterization of psychrotolerant heterotrophic bacteria from Finnish Lapland. *Systematic and Applied Microbiology*, 29(3), 229–243. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2005.09.001>
- Marrone, F., Vecchioni, L., Deidun, A., Mabrouki, Y., Arab, A., & Arculeo, M. (2020). DNA taxonomy of the potamid freshwater crabs from Northern Africa (Decapoda, Potamidae). *Zoologica Scripta*, 49(4), 473–487. <https://doi.org/10.1111/zsc.12415>
- Marsh, P. D. (2006). Dental plaque as a biofilm and a microbial community - Implications for health and disease. *BMC Oral Health*, 6(1), 1–7. <https://doi.org/10.1186/1472-6831-6-S1-S14>
- Martill, D. M. (1990). Macromolecular resolution of fossilized muscle tissue from an elopomorph fish. *Nature*, 346(6280), 171–172. <https://doi.org/10.1038/346171a0>

- Martin, D., Briggs, D. E. G., & Parkes, R. J. (2003). Experimental mineralization of invertebrate eggs and the preservation of Neoproterozoic embryos. *Geology*, *31*(1), 39–42. [https://doi.org/10.1130/0091-7613\(2003\)031<0039:EMOIEA>2.0.CO;2](https://doi.org/10.1130/0091-7613(2003)031<0039:EMOIEA>2.0.CO;2)
- Martin, D., Briggs, D. E. G., & Parkes, R. J. (2004). Experimental attachment of sediment particles to invertebrate eggs and the preservation of soft-bodied fossils. *Journal of the Geological Society*, *161*(5), 735–738. <https://doi.org/10.1144/0016-764903-164>
- Martin, D., Briggs, D. E. G., & Parkes, R. J. (2005). Decay and mineralization of invertebrate eggs. *Palaios*, *20*(6), 562–572. <https://doi.org/10.2110/palo.2004.p04-67>
- Martinez-Porchas, M., Villalpando-Canchola, E., Suarez, L. E. O., & Vargas-Albores, F. (2017). How conserved are the conserved 16S-rRNA regions? *PeerJ*, *5*, 1–20. <https://doi.org/10.7717/peerj.3036>
- Matsushita, O., & Okabe, A. (2001). Clostridial hydrolytic enzymes degrading extracellular components. *Toxicon*, *39*(11), 1769–1780. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(01\)00163-5](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(01)00163-5)
- McAdams, H. H., Srinivasan, B., & Arkin, A. P. (2004). The evolution of genetic regulatory systems in bacteria. *Nature Reviews Genetics*, *5*(3), 169–178. <https://doi.org/10.1038/nrg1292>
- McAlister, M. B., Kulakov, L. A., O’Hanlon, J. F., Larkin, M. J., & Ogden, K. L. (2002). Survival and nutritional requirements of three bacteria isolated from ultrapure water. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, *29*(2), 75–82. <https://doi.org/10.1038/sj.jim.7000273>
- McCarren, J., Becker, J. W., Repeta, D. J., Shi, Y., Young, C. R., Malmstrom, R. R., Chisholm, S. W., & DeLong, E. F. (2010). Microbial community transcriptomes reveal microbes and metabolic pathways associated with dissolved organic matter turnover in the sea. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *107*(38), 16420–16427. <https://doi.org/10.1073/pnas.1010732107>
- McCoy, V. E. (2014). Concretions as agents of soft-tissue preservation: A review. *The Paleontological Society Papers*, *20*, 147–162. <https://doi.org/10.1017/s1089332600002849>
- McCoy, V. E., Young, R. T., & Briggs, D. E. G. (2015). Factors controlling exceptional preservation in concretions. *Palaios*, *30*(4), 272–280. <https://doi.org/10.2110/palo.2014.081>
- McFeters, G. A., Broadaway, S. C., Pyle, B. H., & Egozy, Y. (1993). Distribution of bacteria within operating laboratory water purification systems. *Applied and Environmental Microbiology*, *59*(5), 1410–1415. <https://doi.org/10.1128/aem.59.5.1410-1415.1993>
- McKenna, D. D., & Farrell, B. D. (2005). Molecular phylogenetics and evolution of host plant use in the Neotropical rolled leaf “hispine” beetle genus *Cephaloleia* (Chevrolat) (Chrysomelidae: Cassidinae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, *37*(1), 117–131. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2005.06.011>
- McKenzie, V. J., Bowers, R. M., Fierer, N., Knight, R., & Lauber, C. L. (2012). Co-habiting amphibian species harbor unique skin bacterial communities in wild populations. *The ISME journal*, *6*(3), 588–596. <https://doi.org/10.1038/ismej.2011.129>
- McMahon, S., Anderson, R. P., Saupe, E. E., & Briggs, D. E. G. (2016). Experimental evidence that clay inhibits bacterial decomposers: Implications for preservation of organic fossils. *Geology*, *44*(10), 867–870. <https://doi.org/10.1130/G38454.1>
- McNamara, M. E., Orr, P. J., Kearns, S. L., Alcalá, L., Anadón, P., & Penalver Molla, E. (2009). Soft-tissue preservation in Miocene frogs from Libros, Spain: insights into the genesis of decay microenvironments. *Palaios*, *24*(2), 104–117.
- McNamara, M. E., van Dongen, B. E., Lockyer, N. P., Bull, I. d., & Orr, P. J. (2016). Fossilization of melanosomes via sulfurization. *Palaeontology*, *59*(3), 337–350. <https://doi.org/10.1111/pala.12238>

- Menanteau-Ledouble, S., Kumar, G., Saleh, M., & El-Matbouli, M. (2016). *Aeromonas salmonicida*: Updates on an old acquaintance. *Diseases of Aquatic Organisms*, *120*(1), 49–68. <https://doi.org/10.3354/dao03006>
- Meryandini, A. (2004). Chitinase characterization from *Clostridium bifermentans* Sp2-1. *Hayati (Indonesia)*.
- Metcalf, J. L., Wegener Parfrey, L., Gonzalez, A., Lauber, C. L., Knights, D., Ackermann, G., Humphrey, G. C., Gebert, M. J., Van Treuren, W., Berg-Lyons, D., Keepers, K., Guo, Y., Bullard, J., Fierer, N., Carter, D. O., & Knight, R. (2013). A microbial clock provides an accurate estimate of the postmortem interval in a mouse model system. *ELife*, *2*, 1–19. <https://doi.org/10.7554/elife.01104>
- Metcalf, J. L., Carter, D. O., & Knight, R. (2016). Microbiology of death. *Current Biology*, *26*(13), 561–563. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.03.042>
- Mizan, M. F. R., Jahid, I. K., Park, S. Y., Silva, J. L., Kim, T. J., Myoung, J., & Ha, S. D. (2018). Effects of temperature on biofilm formation and quorum sensing of *Aeromonas hydrophila*. *Italian Journal of Food Science*, *30*(3), 456–466. <https://doi.org/10.14674/IJFS-1004>
- Mobley, H. L. T., & Hausinger, R. P. (1989). Significance, regulation, and molecular characterization. *Microbiological Reviews*, *53*(1), 85–108. [https://doi.org/0146-0749/89/010085-24\\$02.00/0](https://doi.org/0146-0749/89/010085-24$02.00/0)
- Molise, E. M., & Drake, C. H. (1973). Chitinolysis by Serratiae including *Serratia liquefaciens* (*Enterobacter liquefaciens*). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *23*(3), 278–280. <https://doi.org/10.1099/00207713-23-3-278>
- Momot, W. T. (1995). Redefining the role of crayfish in aquatic ecosystems. *Reviews in Fisheries Science*, *3*(1), 33–63. <https://doi.org/10.1080/10641269509388566>
- Montuelle, B., & Volat, B. (1997). Influence of oxygen and temperature on exoenzyme activities in freshwater sediments. *Internationale Vereinigung für theoretische und angewandte Limnologie: Verhandlungen*, *26*(2), 373–376. <https://doi.org/10.1080/03680770.1995.11900737>
- Morgan, X. C., & Huttenhower, C. (2012). Chapter 12: Human Microbiome Analysis. *PLoS Computational Biology*, *8*(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1002808>
- Morrison, K. D., Misra, R., & Williams, L. B. (2016). Unearthing the antibacterial mechanism of medicinal clay: a geochemical approach to combating antibiotic resistance. *Scientific Reports*, *6*(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/srep19043>
- Mugu, S., Pistone, D., & Jordal, B. H. (2018). New molecular markers resolve the phylogenetic position of the enigmatic wood-boring weevils Platypodinae (Coleoptera: Curculionidae). *Arthropod Systematics and Phylogeny*, *76*(1), 45–58. <https://hdl.handle.net/1956/23599>
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., & Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, *51*, 263–273. <https://doi.org/10.1101/SQB.1986.051.01.032>
- Muscente, A. D., Hawkins, A. D., & Xiao, S. (2015). Fossil preservation through phosphatization and silicification in the Ediacaran Doushantuo Formation (South China): a comparative synthesis. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, *434*, 46–62. <https://doi.org/10.1016/j.palaeo.2014.10.013>
- Muyzer, G., Teske, A., Wirsén, C. O., & Jannasch, H. W. (1995). Phylogenetic relationships of Thiomicrospira species and their identification in deep-sea hydrothermal vent samples by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rDNA fragments. *Archives of Microbiology*, *164*(3), 165–172. <https://doi.org/10.1007/BF02529967>
- Naimark, E. B., Kalinina, M. A., Shokurov, A. V., Markov, A. V., & Boeva, N. M. (2016a). Decaying of *Artemia salina* in clay colloids: 14-month experimental formation of subfossils. *Journal of Paleontology*, *90*(3), 472–484. <https://doi.org/10.1017/jpa.2016.23>

- Naimark, E. B., Kalinina, M., Shokurov, A., Boeva, N., Markov, A., & Zaytseva, L. (2016b). Decaying in different clays: implications for soft-tissue preservation. *Palaeontology*, 59(4), 583–595. <https://doi.org/10.1111/pala.12246>
- Naimark, E. B., Boeva, N. M., Kalinina, M. A., & Zaytseva, L. V. (2018a). Complementary transformations of buried organic residues and the ambient sediment: Results of long-term taphonomic experiments. *Paleontological Journal*, 52(2), 109–122. <https://doi.org/10.1134/S0031030118020053>
- Naimark, E. B., Kalinina, M., & Boeva, N. (2018b). Persistence of external anatomy of small crustaceans in a long term taphonomic experiment. *Palaios*, 33(4), 154–163. <https://doi.org/10.2110/palo.2017.083>
- Nakano, M. M., & Zuber, P. (1998). Anaerobic growth of a “strict aerobe” (*Bacillus subtilis*). *Annual Reviews of Microbiology*, 52(1), 165–190. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.52.1.165>
- Nancollas, G. H., & Johnsson, M. A. (1994). Calculus formation and inhibition. *Advances in Dental Research*, 8(2), 307–311. <https://doi.org/10.1177/08959374940080022601>
- Nanglu, K., Caron, J. B., & Cameron, C. B. (2015). Using experimental decay of modern forms to reconstruct the early evolution and morphology of fossil enteropneusts. *Paleobiology*, 41(3), 460–478. <https://doi.org/10.1017/pab.2015.11>
- Neefs, J. M., Van de Peer, Y., De Rijk, P., Chapelle, S., & de Wachter, R. (1993). Compilation of small ribosomal subunit RNA structures. *Nucleic Acids Research*, 21(13), 3025–3049. <https://doi.org/10.1093/nar/21.13.3025>
- Nelson, M. L., & Levy, S. B. (2011). The history of the tetracyclines. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1241(1), 17–32. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2011.06354.x>
- Neuwirth, E. (2014). RColorBrewer: ColorBrewer Palettes. R package version 1.1-2. <https://CRAN.R-project.org/package=RColorBrewer>
- New, M. B. (1995). Status of freshwater prawn farming: a review. *Aquaculture Research*, 26(1), 1–54. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.1995.tb00859.x>
- Newman, S. A., Daye, M., Fakra, S. C., Marcus, M. A., Pajusalu, M., Pruss, S. B., Smith, E. F., & Bosak, T. (2019). Experimental preservation of muscle tissue in quartz sand and kaolinite. *Palaios*, 34(9), 437–451. <https://doi.org/10.2110/palo.2019.030>
- Nielsen, K. M., Johnsen, P. J., Bensasson, D., & Daffonchio, D. (2007). Release and persistence of extracellular DNA in the environment. *Environmental Biosafety Research*, 6(1–2), 37–53. <https://doi.org/10.1051/ebr:2007031>
- Nocker, A., Cheung, C. Y., & Camper, A. K. (2006). Comparison of propidium monoazide with ethidium monoazide for differentiation of live vs. dead bacteria by selective removal of DNA from dead cells. *Journal of Microbiological Methods*, 67(2), 310–320. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2006.04.015>
- Nocker, A., Sossa, K. E., & Camper, A. K. (2007). Molecular monitoring of disinfection efficacy using propidium monoazide in combination with quantitative PCR. *Journal of Microbiological Methods*, 70(2), 252–260. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2007.04.014>
- O’Brien, N. R., Meyer, H. W., & Harding, I. C. (2008). The role of biofilms in fossil preservation, Florissant Formation, Colorado. *Paleontology of the Upper Eocene Florissant Formation, Colorado*, 435, 19.
- O’Toole, G., Kaplan, H. B., & Kolter, R. (2000). Biofilm formation as microbial development. *Annual Reviews in Microbiology*, 54(1), 49–79. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.54.1.49>
- Ohtsuka, T., Kudoh, S., Imura, S., & Ohtani, S. (2006). Diatoms composing benthic microbial mats in freshwater lakes of Skarvsnes ice-free area, East Antarctica. *Polar Bioscience*, 20, 113–130. <http://doi.org/10.15094/00006265>

- Ojo-Okunola, A., Claassen-Weitz, S., Mwaikono, K. S., Gardner-Lubbe, S., Zar, H. J., Nicol, M. P., & Toit, E. du. (2020). The influence of DNA extraction and lipid removal on human milk bacterial profiles. *Methods and Protocols*, 3(2), 1–17. <https://doi.org/10.3390/mps3020039>
- Onuma, K., Oyane, A., Kokubo, T., Kanzaki, G. T. N., & Itot, A. (2000). Nucleation of calcium phosphate on 11-Mercaptoundecanoic acid self-assembled monolayer in a pseudophysiological solution. *Journal of Physical Chemistry B*, 104(50), 11950–11956. <https://doi.org/10.1021/jp002015p>
- Orr, P. J., Briggs, D. E. G., & Kearns, S. L. (1998). Cambrian Burgess Shale animals replicated in clay minerals. *Science*, 281(5380), 1173–1175. <https://doi.org/10.1126/science.281.5380.1173>
- Ozbayram, E. G., Kleinstuber, S., Nikolausz, M., Ince, B., & Ince, O. (2017). Effect of bioaugmentation by cellulolytic bacteria enriched from sheep rumen on methane production from wheat straw. *Anaerobe*, 46, 122–130. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2017.03.013>
- Pacífico, C., Petri, R. M., Ricci, S., Mickdam, E., Wetzels, S. U., Neubauer, V., & Zebeli, Q. (2021). Unveiling the bovine epimural microbiota composition and putative function. *Microorganisms*, 9(2), 1–23. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9020342>
- Pantaléon, V., Bouttier, S., Soavelomandroso, A. P., Janoir, C., & Candela, T. (2014). Biofilms of *Clostridium* species. *Anaerobe*, 30, 193–198. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2014.09.010>
- Papageorgopoulou, C., Link, K., & Rühli, F. J. (2015). Histology of a woolly mammoth (*Mammuthus primigenius*) preserved in Permafrost, Yamal Peninsula, Northwest Siberia. *Anatomical Record*, 298(6), 1059–1071. <https://doi.org/10.1002/ar.23148>
- Parry, L. A., Smithwick, F., Nordén, K. K., Saitta, E. T., Lozano-Fernandez, J., Tanner, A. R., Caron, J. B., Edgecombe, G. D., Briggs, D. E. G., & Vinther, J. (2017). Soft-bodied fossils are not simply rotten carcasses – Toward a holistic understanding of exceptional fossil preservation. *BioEssays*, 40(1), 1–11. <https://doi.org/10.1002/bies.201700167>
- Patel, J. (2001). 16S rRNA gene sequencing for bacterial pathogen identification in the clinical laboratory. *Molecular Diagnosis*, 6(4), 313–321. <https://doi.org/10.1054/modi.2001.29158>
- Pechal, J. L., Crippen, T. L., Benbow, M. E., Tarone, A. M., Dowd, S., & Tomberlin, J. K. (2014). The potential use of bacterial community succession in forensics as described by high throughput metagenomic sequencing. *International Journal of Legal Medicine*, 128(1), 193–205. <https://doi.org/10.1007/s00414-013-0872-1>
- Pemberton, J. M., Kidd, S. P., & Schmidt, R. (1997). Secreted enzymes of *Aeromonas*. *FEMS Microbiology Letters*, 152(1), 1–10. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(97\)00186-9](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(97)00186-9)
- Penning, R. (2006) Rechtsmedizin systematisch. *Uni Med-Verlag*, Bremen.
- Percival, S. L., & Williams, D. W. (2014). *Aeromonas*. In *Microbiology of Waterborne Diseases*. Academic Press. 49–64. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-415846-7.00003-2>
- Peris, D., Janssen, K., Barthel, H. J., Bierbaum, G., Delclòs, X., Peñalver, E., Solórzano-Kraemer, M. M., Jordal, B. H., & Rust, J. (2020). DNA from resin-embedded organisms: Past, present and future. *PLoS ONE*, 15(9), 1–21. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0239521>
- Peterson, J. E., Lenczewski, M. E., & Scherer, R. P. (2010). Influence of microbial biofilms on the preservation of primary soft tissue in fossil and extant archosaurs. *PLoS ONE*, 5(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013334>
- Petrovich, R. (2001). Mechanisms of fossilization of the soft-bodied and lightly armored faunas of the Burgess Shale and of some other classical localities. *American Journal of Science*, 301(8), 683–726. <https://doi.org/10.2475/ajs.301.8.683>

- Phoenix, V. R., Konhauser, K. O., & Ferris, F. G. (2003). Experimental study of iron and silica immobilization by bacteria in mixed Fe-Si systems: Implications for microbial silicification in hot springs. *Canadian Journal of Earth Sciences*, *40*(11), 1669–1678. <https://doi.org/10.1139/e03-044>
- Pikuta, E. V., Hoover, R. B., Marsic, D., Whitman, W. B., Lupa, B., Tang, J., & Krader, P. (2009). *Proteocatella sphenisci* gen. nov., sp. nov., a psychrotolerant, spore-forming anaerobe isolated from penguin guano. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *59*(9), 2302–2307. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.002816-0>
- Pinheiro, F. L., Horn, B. L. D., Schultz, C. L., De Andrade, J. A. F. G., & Sucerquia, P. A. (2012). Fossilized bacteria in a Cretaceous pterosaur headcrest. *Lethaia*, *45*(4), 495–499. <https://doi.org/10.1111/j.1502-3931.2012.00309.x>
- Pinheiro, F. L., Prado, G., Ito, S., Simon, J. D., Wakamatsu, K., Anelli, L. E., Andrade, J. A. F., & Glass, K. (2019). Chemical characterization of pterosaur melanin challenges color inferences in extinct animals. *Scientific Reports*, *9*(1), 15947. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-52318-y>
- Pistone, D., Mugu, S., & Jordal, B. H. (2016). Genomic mining of phylogenetically informative nuclear markers in bark and ambrosia beetles. *PLoS ONE*, *11*(9), 1–26. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0163529>
- Pollock, J., Glendinning, L., Wisedchanwet, T., & Watson, M. (2018). The madness of microbiome: attempting to find consensus “best practice” for 16S microbiome studies. *Applied and Environmental Microbiology*, *84*(7). <https://doi.org/10.1128/AEM.02627-17>
- Pratt, L. A., & Kolter, R. (1998). Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: Roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. *Molecular Microbiology*, *30*(2), 285–293. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1998.01061.x>
- Preston, L. J., Shuster, J., Fernández-Remolar, D., Banerjee, N. R., Osinski, G. R., & Southam, G. (2011). The preservation and degradation of filamentous bacteria and biomolecules within iron oxide deposits at Rio Tinto, Spain. *Geobiology*, *9*(3), 233–249. <https://doi.org/10.1111/j.1472-4669.2011.00275.x>
- Prieto-Barajas, C. M., Valencia-Cantero, E., & Santoyo, G. (2018). Microbial mat ecosystems: Structure types, functional diversity, and biotechnological application. *Electronic Journal of Biotechnology*, *31*, 48–56. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2017.11.001>
- Pruesse, E., Quast, C., Knittel, K., Fuchs, B. M., Ludwig, W., Peplies, J., & Glöckner, F. O. (2007). SILVA: A comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB. *Nucleic Acids Research*, *35*(21), 7188–7196. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm864>
- Purnell, M. A., Donoghue, P. J. C., Gabbott, S. E., McNamara, M. E., Murdock, D. J. E., & Sansom, R. S. (2018). Experimental analysis of soft-tissue fossilization: opening the black box. *Palaeontology*, *61*(3), 317–323. <https://doi.org/10.1111/pala.12360>
- Qi, W., Nong, G., Preston, J. F., Ben-Ami, F., & Ebert, D. (2009). Comparative metagenomics of *Daphnia* symbionts. *BMC Genomics*, *10*(1), 1–21. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-10-172>
- Qian, W., Ao, W., Jia, C., & Li, Z. (2019). Bacterial colonisation of reeds and cottonseed hulls in the rumen of Tarim red deer (*Cervus elaphus yarkandensis*). *Antonie van Leeuwenhoek*, *112*(9), 1283–1296. <https://doi.org/10.1007/s10482-019-01260-0>
- Qiu, Z., Wang, J., Delgado-Baquerizo, M., Trivedi, P., Egidi, E., Chen, Y. M., Zhang, H., & Singh, B. K. (2020). Plant Microbiomes: Do different preservation approaches and Ppimer sets alter our capacity to assess microbial diversity and community composition? *Frontiers in Plant Science*, *11*, 1–11. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00993>
- Quince, C., Walker, A. W., Simpson, J. T., Loman, N. J., & Segata, N. (2017). Shotgun metagenomics, from sampling to analysis. *Nature Biotechnology*, *35*(9), 833–844. <https://doi.org/10.1038/nbt.3935>

- Raff, E. C., Villinski, J. T., Turner, F. R., Donoghue, P. C. J., & Raff, R. A. (2006). Experimental taphonomy shows the feasibility of fossil embryos. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *103*(15), 5846–5851. <https://doi.org/10.1073/pnas.0601536103>
- Raff, E. C., Schollaert, K. L., Nelson, D. E., Donoghue, P. C. J., Thomas, C. W., Turner, F. R., Stein, B. D., Dong, X., Bengtson, S., Huldtgren, T., Stampanoni, M., Chongyu, Y., & Raff, R. A. (2008). Embryo fossilization is a biological process mediated by microbial biofilms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *105*(49), 19360–19365. <https://doi.org/10.1073/pnas.0810106105>
- Raff, E. C., Andrews, M. E., Turner, F. R., Toh, E., Nelson, D. E., & Raff, R. A. (2013). Contingent interactions among biofilm-forming bacteria determine preservation or decay in the first steps toward fossilization of marine embryos. *Evolution and Development*, *15*(4), 243–256. <https://doi.org/10.1111/ede.12028>
- Raff, R. A., Andrews, M. E., Pearson, R. L., Turner, F. R., Saur, S. T., Thomas, D. C., Eagan, J. L., & Raff, E. C. (2014). Microbial ecology and biofilms in the taphonomy of soft tissues. *Palaios*, *29*(11), 560–569. <https://doi.org/10.2110/palo.2014.043>
- Raff, R. A., & Raff, E. C. (2014). The Role of Biology in the Fossilization of Embryos and Other Soft-Bodied Organisms: Microbial Biofilms and Lagerstätten. *The Paleontological Society Papers*, *20*, 83–100. <https://doi.org/10.1017/s1089332600002813>
- Raiswell, R. (1993). Kinetic controls on depth variations in localised pyrite formation. *Chemical Geology*, *107*(3–4), 467–469. [https://doi.org/10.1016/0009-2541\(93\)90233-9](https://doi.org/10.1016/0009-2541(93)90233-9)
- Raiswell, R. (1997). A geochemical framework for the application of stable sulphur isotopes to fossil pyritization. *Journal of the Geological Society*, *154*(2), 343–356. <https://doi.org/10.1144/gsjgs.154.2.0343>
- Rasmussen, B. (2000). Filamentous microfossils in a 3,235-million-year-old volcanogenic massive sulphide deposit. *Nature*, *405*(6787), 676–679. <https://doi.org/10.1021/ic100796e>
- Ravachol, J., De Philip, P., Borne, R., Mansuelle, P., Maté, M. J., Perret, S., & Fierobe, H. P. (2016). Mechanisms involved in xyloglucan catabolism by the cellulosome-producing bacterium *Ruminiclostridium cellulolyticum*. *Scientific Reports*, *6*(1), 1–17. <https://doi.org/10.1038/srep22770>
- Reitner, Joachim, Paul, J., Arp, G., & Hause-Reitner, D. (1996). Lake Thetis domal microbialites - a complex framework of calcified biofilms and organomicrites (Cervantes, Western Australia). In *Globale und regionale Steuerungsfaktoren biogener Sedimentation*, 85–89. <http://resolver.sub.uni-goettingen.de/purl?gs-1/5067>
- Reitner, J. (2004). Organomineralization: A clue to the understanding of meteorite-related “bacteria-shaped” carbonate particles. In *Origins*, 195–212. Springer. <https://doi.org/10.1007/978-90-481-3799-2>
- Reitner, Joachim. (2011). Biofilms and Fossilization. In *Encyclopedia of Geobiology*.
- Riley, P. A. (1997). Molecules in Focus: Melanin. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, *29*(11), 1235–1239. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2019.12.042>
- Rivadeneira, M. A., Pérez-García, I., & Ramos-Cormenzana, A. (1992). Struvite precipitation by soil and fresh water bacteria. *Current Microbiology*, *24*(6), 343–347. <https://doi.org/10.1007/BF01571105>
- Roberson, E. B., & Firestone, M. K. (1992). Relationship between desiccation and exopolysaccharide production in a soil *Pseudomonas* sp. *Applied and Environmental Microbiology*, *58*(4), 1284–1291. <https://doi.org/10.1128/aem.58.4.1284-1291.1992>
- Robertson, C. E., Spear, J. R., Harris, J. K., & Pace, N. R. (2009). Diversity and stratification of archaea in a hypersaline microbial mat. *Applied and Environmental Microbiology*, *75*(7), 1801–1810. <https://doi.org/10.1128/AEM.01811-08>

- Rocha, J., & Manaia, C. M. (2020). Cell-based internal standard for qPCR determinations of antibiotic resistance indicators in environmental water samples. *Ecological Indicators*, *113*, 106194. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2020.106194>
- Rouillard, J., García-Ruiz, J. M., Gong, J., & van Zuilen, M. A. (2018). A morphogram for silica-witherite biomorphs and its application to microfossil identification in the early earth rock record. *Geobiology*, *16*(3), 279–296. <https://doi.org/10.1111/gbi.12278>
- Rozanov, A. Y., & Astafieva, M. M. (2009). The evolution of the early precambrian geobiological systems. *Paleontological Journal*, *43*(8), 911–927. <https://doi.org/10.1134/s0031030109080103>
- Rungrassamee, W., Klanchui, A., Maibunkaew, S., Chaiyapechara, S., Jiravanichpaisal, P., & Karoonuthaisiri, N. (2014). Characterization of intestinal bacteria in wild and domesticated adult black Tiger Shrimp (*Penaeus monodon*). *PLoS ONE*, *9*(3), e91853. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0091853>
- Ruparell, A., Inui, T., Staunton, R., Wallis, C., Deusch, O., & Holcombe, L. J. (2020). The canine oral microbiome: Variation in bacterial populations across different niches. *BMC Microbiology*, *20*(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s12866-020-1704-3>
- Sagemann, J., Bale, S. J., Briggs, D. E. G., & Parkes, R. J. (1999). Controls on the formation of authigenic minerals in association with decaying organic matter: An experimental approach. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, *63*(7–8), 1083–1095. [https://doi.org/10.1016/S0016-7037\(99\)00087-3](https://doi.org/10.1016/S0016-7037(99)00087-3)
- Salter, S. J., Cox, M. J., Turek, E. M., Calus, S. T., Cookson, W. O., Moffatt, M. F., Turner, P., Parkhill, J., Loman, N. J., & Walker, A. W. (2014). Reagent and laboratory contamination can critically impact sequence-based microbiome analyses. *BMC Biology*, *12*(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s12915-014-0087-z>
- Sands, K. M., Twigg, J. A., Lewis, M. A. O., Wise, M. P., Marchesi, J. R., Smith, A., Wilson, M. J., & Williams, D. W. (2016). Microbial profiling of dental plaque from mechanically ventilated patients. *Journal of Medical Microbiology*, *65*(2), 147–159. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000212>
- Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *74*(12), 5463–5467.
- Sansom, R. S. (2014). Experimental decay of soft tissues. *The Paleontological Society Papers*, *20*, 259–274. <https://doi.org/10.1017/s1089332600002886>
- Sare, A. R., Stouvenakers, G., Eck, M., Lampens, A., Goormachtig, S., Jijakli, M. H., & Massart, S. (2020). Standardization of plant microbiome studies: Which proportion of the microbiota is really harvested? *Microorganisms*, *8*(3). <https://doi.org/10.3390/microorganisms8030342>
- Sárvári, K. P., & Schoblocher, D. (2020). The antibiotic susceptibility pattern of gas gangrene-forming *Clostridium* spp. clinical isolates from South-Eastern Hungary. *Infectious Diseases*, *52*(3), 196–201. <https://doi.org/10.1080/23744235.2019.1696472>
- Sautour, M., Mary, P., Chihib, N. E., & Hornez, J. P. (2003). The effects of temperature, water activity and pH on the growth of *Aeromonas hydrophila* and on its subsequent survival in microcosm water. *Journal of Applied Microbiology*, *95*(4), 807–813. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.02048.x>
- Schiffbauer, J. D., Wallace, A. F., Broce, J., & Xiao, S. (2014). Exceptional fossil conservation through phosphatization. *The Paleontological Society Papers*, *20*, 59–82. <https://doi.org/10.1017/S1089332600002801>
- Schlegel, H. G., & Jannasch, H. W. (2006). Prokaryotes and their habitats. *The Prokaryotes*, *1*, 137–184. <https://doi.org/10.1007/0-387-30741-9>

- Schneider, D., Arp, G., Reimer, A., Reitner, J., & Daniel, R. (2013). Phylogenetic analysis of a microbialite-forming microbial mat from a hypersaline Lake of the Kiritimati Atoll, Central Pacific. *PLoS ONE*, 8(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066662>
- Schoenen, D., & Schoenen, H. (2013). Adipocere formation-The result of insufficient microbial degradation. *Forensic Science International*, 226(1–3), 301.e1. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2013.01.023>
- Schopf, J. W. (1993). Microfossils of the early Archean apex chert: New evidence of the antiquity of life. *Science*, 260(5108), 640–646. <https://doi.org/10.1126/science.260.5108.640>
- Schopf, J. W., Kudryavtsev, A. B., Czaja, A. D., & Tripathi, A. B. (2007). Evidence of Archean life: stromatolites and microfossils. *Precambrian Research*, 158(3-4), 141-155. <https://doi.org/10.1016/j.precamres.2007.04.009>
- Schruth, D. (2013). caroline: A collection of database, data structure, visualization, and utility functions for R. R package version 0.7.6. <https://CRAN.R-project.org/package=caroline>
- Schwarz, C., Debruyne, R., Kuch, M., McNally, E., Schwarcz, H., Aubrey, A. D., Bada, J., & Poinar, H. (2009). New insights from old bones: DNA preservation and degradation in permafrost preserved mammoth remains. *Nucleic Acids Research*, 37(10), 3215–3229. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp159>
- Schweitzer, M. H. (2011). Soft tissue preservation in terrestrial mesozoic vertebrates. *Annual Review of Earth and Planetary Sciences*, 39, 187–216. <https://doi.org/10.1146/annurev-earth-040610-133502>
- Schwermann, A. H., Wuttke, M., & Schultz, J. A. (2012). Virtopsy of the controlled decomposition of a dormouse *Eliomys quercinus* as a tool to analyse the taphonomy of *Heterohyus nanus* from Messel (Eocene, Germany). *Palaeobiodiversity and Palaeoenvironments*, 92(1), 29–43. <https://doi.org/10.1007/s12549-011-0063-3>
- Seifan, M., Samani, A. K., & Berenjian, A. (2016). Induced calcium carbonate precipitation using *Bacillus* species. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(23), 9895–9906. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7701-7>
- Seilacher, A. (1970). Arbeitskonzept zur Konstruktions-Morphologie. *Lethaia*, 3(4), 393-396. <https://doi.org/10.1111/j.1502-3931.1970.tb00830.x>
- Seilacher, A., Reif, W. E., & Westphal, F. (1985). Sedimentological, ecological and temporal patterns of fossil Lagerstätten. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences*, 311(1148), 5-24. <https://doi.org/10.1098/rstb.1985.0134>
- Shah, N. B., Nigwekar, S. U., Kalim, S., Lelouvier, B., Servant, F., Dalal, M., Krinsky, S., Fasano, A., Tolkoff-Rubin, N., & Allegretti, A. S. (2021). The gut and blood microbiome in IgA nephropathy and healthy controls. *Kidney360*, 410. <https://doi.org/10.34067/kid.0000132021>
- Shan, Y., Lai, Y., & Yan, A. (2012). Metabolic reprogramming under microaerobic and anaerobic conditions in bacteria. *Reprogramming microbial metabolic pathways*, 159–179. <https://doi.org/10.1007/978-94-007-5055-5>
- Shen, H., Rogelj, S., & Kieft, T. L. (2006). Sensitive, real-time PCR detects low-levels of contamination by *Legionella pneumophila* in commercial reagents. *Molecular and Cellular Probes*, 20(3–4), 147–153. <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2005.09.007>
- Sheng, T., Zhao, L., Gao, L. F., Liu, W. Z., Cui, M. H., Guo, Z. C., Ma, X. D., Ho, S. H., & Wang, A. J. (2016). Lignocellulosic saccharification by a newly isolated bacterium, *Ruminiclostridium thermocellum* M3 and cellular cellulase activities for high ratio of glucose to cellobiose. *Biotechnology for Biofuels*, 9(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s13068-016-0585-z>
- Shui, Y., Guan, Z. B., Liu, G. F., & Fan, L. M. (2020). Gut microbiota of red swamp crayfish *Procambarus clarkii* in integrated crayfish - rice cultivation model. *AMB Express*, 10(1), 1-11. <https://doi.org/10.1186/s13568-019-0944-9>

- Shukla, S., & Rao, T. S. (2017). An improved crystal violet assay for biofilm quantification in 96-well microtitre plate. *BioRxiv*, 100214. <https://doi.org/10.1101/100214>
- Sidstedt, M., Steffen, C. R., Kiesler, K. M., Vallone, P. M., Rådström, P., & Hedman, J. (2019). The impact of common PCR inhibitors on forensic MPS analysis. *Forensic Science International: Genetics*, 40, 182–191. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2019.03.001>
- Silva, M. O. D., Blom, J. F., Yankova, Y., Villiger, J., & Pernthaler, J. (2018). Priming of microbial microcystin degradation in biomass-fed gravity driven membrane filtration biofilms. *Systematic and Applied Microbiology*, 41(3), 221–231. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2017.11.009>
- Singhal, P. K., Gaur, S., & Talegaonkar, L. (1992). Relative contribution of different decay processes to the decomposition of *Eichhornia crassipes*. *Aquatic Botany*, 42(3), 265–272. [https://doi.org/10.1016/0304-3770\(92\)90027-G](https://doi.org/10.1016/0304-3770(92)90027-G)
- Sinsabaugh, R. L., Repert, D., Weiland, T., Golladay, S. W., & Linkins, A. E. (1991). Exoenzyme accumulation in epilithic biofilms. *Hydrobiologia*, 222(1), 29–37. <https://doi.org/10.1007/BF00017497>
- Skawina, A. (2010). Experimental decay of gills in freshwater bivalves as a key to understanding their preservation in upper Triassic lacustrine deposits. *Palaios*, 25(3), 215–220. <https://doi.org/10.2110/palo.2009.p09-081r>
- Skelton, J., Geyer, K. M., Lennon, J. T., Creed, R. P., & Brown, B. L. (2017). Multi-scale ecological filters shape the crayfish microbiome. *Symbiosis*, 72(3), 159–170. <https://doi.org/10.1007/s13199-016-0469-9>
- Song, F., Kuehl, J. V., Chandran, A., & Arkin, A. P. (2021). A simple, cost-effective and automation-friendly direct PCR approach for bacterial community analysis. Preprint: *BioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2021.03.01.433496>
- Srinivas, T. N. R., Manasa, P., Begum, Z., Sunil, B., Sailaja, B., Singh, S. K., Prasad, S., & Shivaji, S. (2013). *Iodobacter arcticus* sp. nov., a psychrotolerant bacterium isolated from meltwater stream sediment of an Arctic glacier. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63(8), 2800–2805. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.044776-0>
- Stadnitskaia, A., Nadezhkin, D., Abbas, B., Blinova, V., Ivanov, M. K., & Sinninghe Damsté, J. S. (2008). Carbonate formation by anaerobic oxidation of methane: Evidence from lipid biomarker and fossil 16S rDNA. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 72(7), 1824–1836. <https://doi.org/10.1016/j.gca.2008.01.020>
- Stal, L. J., van Gemerden, H., & Krumbein, W. E. (1985). Structure and development of a benthic marine microbial mat. *FEMS Microbiology Letters*, 31(2), 111–125. [https://doi.org/10.1016/0378-1097\(85\)90007-2](https://doi.org/10.1016/0378-1097(85)90007-2)
- Stankiewicz, A. B., Mastalerz, M., Hof, C. H. J., Bierstedt, A., Flannery, M. B., E. G. Briggs, D., & Evershed, R. P. (1998). Biodegradation of the chitin-protein complex in crustacean cuticle. *Organic Geochemistry*, 28(1–2), 67–76. [https://doi.org/10.1016/S0146-6380\(97\)00113-7](https://doi.org/10.1016/S0146-6380(97)00113-7)
- Stepanović, S., Vuković, D., Dakić, I., Savić, B., & Švabić-Vlahović, M. (2000). A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *Journal of Microbiological Methods*, 40(2), 175–179. [https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(00\)00122-6](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(00)00122-6)
- Stepanović, S., Ćirković, I., Mijač, V., & Švabić-Vlahović, M. (2003). Influence of the incubation temperature, atmosphere and dynamic conditions on biofilm formation by *Salmonella* spp. *Food Microbiology*, 20(3), 339–343. [https://doi.org/10.1016/S0740-0020\(02\)00123-5](https://doi.org/10.1016/S0740-0020(02)00123-5)
- Stewart, P. S., & Franklin, M. J. (2008). Physiological heterogeneity in biofilms. *Nature Reviews Microbiology*, 6(3), 199–210. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1838>
- Stickler, D. J. (2008). Bacterial biofilms in patients with indwelling urinary catheters. *Nature Clinical Practice Urology*, 5(11), 598–608. <https://doi.org/10.1038/ncpuro1231>

- Stockdale, A., Davison, W., & Zhang, H. (2010). Formation of iron sulfide at faecal pellets and other microniches within suboxic surface sediment. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 74(9), 2665–2676. <https://doi.org/10.1016/j.gca.2010.02.005>
- Stocks-Fischer, S., Galinat, J. K., & Bang, S. S. (1999). Microbiological precipitation of CaCO₃. *Soil Biology and Biochemistry*, 31(11), 1563–1571. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(99\)00082-6](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(99)00082-6)
- Stolz, J. F. (2000). Structure of microbial mats and biofilms. In *Microbial sediments*, 1-8. Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-662-04036-2_1
- Su, W., Zhou, Z., Jiang, F., Chang, X. L., Liu, Y., Wang, S., Kan, W., Xiao, M., Shao, M., Peng, F., & Fang, C. (2013). *Iodobacter limnosediminis* sp. nov., isolated from Arctic lake sediment. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63(4), 1464–1470. <https://doi.org/10.1099/ijms.0.039982-0>
- Su, X. L., Tian, Q., Zhang, J., Yuan, X. Z., Shi, X. S., Guo, R. B., & Qiu, Y. L. (2014). *Acetobacteroides hydrogenigenes* gen. nov., sp. nov., an anaerobic hydrogen-producing bacterium in the family Rikenellaceae isolated from a reed swamp. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 64(9), 2986–2991. <https://doi.org/10.1099/ijms.0.063917-0>
- Sukhanova, E. V., Shtykova, Y. R., Suslova, M. Y., Pestunova, O. S., Kostornova, T. Y., Khanaev, I. V., Zimens, E. A., Podlesnaya, G. V., & Parfenova, V. V. (2019). Diversity and physiological and biochemical properties of heterotrophic bacteria isolated from Lake Baikal epilithic biofilms. *Microbiology (Russian Federation)*, 88(3), 324–334. <https://doi.org/10.1134/S0026261719030147>
- Sun, S., Korheina, D. K. A., Fu, H., & Ge, X. (2020). Chronic exposure to dietary antibiotics affects intestinal health and antibiotic resistance gene abundance in oriental river prawn (*Macrobrachium nipponense*), and provokes human health risk. *Science of the Total Environment*, 720, 137478. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.137478>
- Sun, Y., Wlcott, R. D., & Dowd, S. E. (2011). Tag-encoded FLX amplicon pyrosequencing for the elucidation of microbial and functional gene diversity in any environment. In *High-Throughput Next Generation Sequencing*, 129–141. Humana Press, Totowa, NJ. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-089-8_9
- Sutherland, I. W. (2001a). Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology*, 147(1), 3–9. <https://doi.org/10.1099/00221287-147-1-3>
- Sutherland, I. W. (2001b). The biofilm matrix – an immobilized but dynamic microbial environment. *Trends in Microbiology*, 9(5), 222–227. [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(01\)02012-1](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(01)02012-1)
- Suzuki, S., Ishii, S., Wu, A., Cheung, A., Tenney, A., Wanger, G., Kuenen, J. G., & Neelson, K. H. (2013). Microbial diversity in the Cedars, an ultrabasic, ultrareducing, and low salinity serpentinizing ecosystem. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(38), 15336–15341. <https://doi.org/10.1073/pnas.1302426110>
- Swift, S., Karlyshev, A. V., Fish, L., Durant, E. L., Winson, M. K., Chhabra, S. R., Williams, P., Macintyre, S., & Stewart, G. S. A. B. (1997). Quorum sensing in *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas salmonicida*: Identification of the LuxRI homologs AhyRI and AsaRI and their cognate N-acylhomoserine lactone signal molecules. *Journal of Bacteriology*, 179(17), 5271–5281. <https://doi.org/10.1128/jb.179.17.5271-5281.1997>
- Swift, S., Lynch, M. J., Fish, L., Kirke, D. F., Tomás, J. M., Stewart, G. S. A. B., & Williams, P. (1999). Quorum sensing-dependent regulation and blockade of exoprotease production in *Aeromonas hydrophila*. *Infection and Immunity*, 67(10), 5192–5199. <https://doi.org/10.1128/iai.67.10.5192-5199.1999>
- Brzezinska, M. S., & Donderski, W. (2001). Occurrence and activity of the chitinolytic bacteria of *Aeromonas* genus. *Polish Journal of Environmental Studies*, 10(1), 27–31.

- Talagrand-Reboul, E., Jumas-Bilak, E., & Lamy, B. (2017). The social life of *Aeromonas* through biofilm and quorum sensing systems. *Frontiers in Microbiology*, 8, 37. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00037>
- Tang, K. W., Hutalle, K. M. L., & Grossart, H. P. (2006). Microbial abundance, composition and enzymatic activity during decomposition of copepod carcasses. *Aquatic Microbial Ecology*, 45(3), 219–227. <https://doi.org/10.3354/ame045219>
- Tang, Y., Ma, K. Y., Cheung, M. K., & Cheung, M. K. (2021). Gut microbiota in decapod shrimps: Evidence of phyllosymbiosis. *Microbial ecology*, 1-14. <https://doi.org/10.1007/s00248-021-01720-z>
- Tláskal, V., Voříšková, J., & Baldrian, P. (2016). Bacterial succession on decomposing leaf litter exhibits a specific occurrence pattern of cellulolytic taxa and potential decomposers of fungal mycelia. *FEMS Microbiology Ecology*, 92(11), 177. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiw177>
- Toepfer, G. (2011). Historisches Wörterbuch der Biologie. In *Historisches Wörterbuch der Biologie*. <https://doi.org/10.1007/978-3-476-00455-0>
- Trewin, N. H., & Knoll, A. H. (1999). Preservation of Devonian chemotrophic filamentous bacteria in calcite veins. *Palaios*, 14(3), 288–294. <https://doi.org/10.2307/3515441>
- Tso, J. Y., & Siebel, C. (1989). Cloning and expression of the phospholipase C gene from *Clostridium perfringens* and *Clostridium bifermentans*. *Infection and Immunity*, 57(2), 468–476. <https://doi.org/10.1128/iai.57.2.468-476.1989>
- Turner, S., Pryer, K. M., Miao, V. P. W., & Palmer, J. D. (1999). Investigating deep phylogenetic relationships among cyanobacteria and plastids by small subunit rRNA sequence analysis. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 46(4), 327–338. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1999.tb04612.x>
- Tzeng, T. Der, Pao, Y. Y., Chen, P. C., Weng, F. C. H., Jean, W. D., & Wang, D. (2015). Effects of host phylogeny and habitats on gut microbiomes of oriental river prawn (*Macrobrachium nipponense*). *PLoS ONE*, 10(7), 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0132860>
- Uchiyama, T., Kakizaki, E., Kozawa, S., Nishida, S., Imamura, N., & Yukawa, N. (2012). A new molecular approach to help conclude drowning as a cause of death: Simultaneous detection of eight bacterioplankton species using real-time PCR assays with TaqMan probes. *Forensic Science International*, 222(1–3), 11–26. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2012.04.029>
- Uden, G., Becker, S., Bongaerts, J., Schirawski, J., & Six, S. (1994). Oxygen regulated gene expression in facultatively anaerobic bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 66(1–3), 3–22. <https://doi.org/10.1007/BF00871629>
- Van Lith, Y., Warthmann, R., Vasconcelos, C., & McKenzie, J. A. (2003). Microbial fossilization in carbonate sediments: A result of the bacterial surface involvement in dolomite precipitation. *Sedimentology*, 50(2), 237–245. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3091.2003.00550.x>
- Vasconcelos, C., Warthmann, R., McKenzie, J. A., Visscher, P. T., Bittermann, A. G., & van Lith, Y. (2006). Lithifying microbial mats in Lagoa Vermelha, Brazil: Modern Precambrian relics? *Sedimentary Geology*, 185(3-4), 175–183. <https://doi.org/10.1016/j.sedgeo.2005.12.022>
- Vass, A. A. (2001). Beyond the grave – understanding human decomposition. *Microbiology Today*, 28, 190–193.
- Vazquez-Moreno, M., Perez-Herrera, A., Locia-Morales, D., Dizzel, S., Meyre, D., Stearns, J. C., & Cruz, M. (2021). Association of gut microbiome with fasting triglycerides, fasting insulin and obesity status in Mexican children. *Pediatric Obesity*, 16(5). <https://doi.org/10.1111/ijpo.12748>
- Vinther, J., Briggs, D. E. G., Prum, R. O., & Saranathan, V. (2008). The colour of fossil feathers. *Biology Letters*, 4(5), 522–525. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2008.0302>

- Visscher, P. T., & van Gernerden, H. (1991). Production and consumption of dimethylsulfoniopropionate in marine microbial mats. *Applied and Environmental Microbiology*, 57(11), 3237–3242. <https://doi.org/10.1128/aem.57.11.3237-3242.1991>
- Visscher, P. T., Reid, P. R., & Bebout, B. M. (2000). Microscale observations of sulfate reduction: Correlation of microbial activity with lithified micritic laminae in modern marine stromatolites. *Geology*, 28(10), 919–922. [https://doi.org/10.1130/0091-7613\(2000\)028<0919:MOOSRC>2.3.CO;2](https://doi.org/10.1130/0091-7613(2000)028<0919:MOOSRC>2.3.CO;2)
- Vogt, G. (2019). Functional cytology of the hepatopancreas of decapod crustaceans. *Journal of morphology*, 280(9), 1405–1444. <https://doi.org/10.1002/jmor.21040>
- Wacey, D., Kilburn, M. R., Saunders, M., Cliff, J., & Brasier, M. D. (2011). Microfossils of sulphur-metabolizing cells in 3.4-billion-year-old rocks of Western Australia. *Nature Geoscience*, 4(10), 698–702. <https://doi.org/10.1038/ngeo1238>
- Wacey, D., Menon, S., Green, L., Gerstmann, D., Kong, C., Mcloughlin, N., Saunders, M., & Brasier, M. (2012). Taphonomy of very ancient microfossils from the ~ 3400 Ma Strelley Pool Formation and ~ 1900 Ma Gunflint Formation: New insights using a focused ion beam. *Precambrian Research*, 220, 234–250. <https://doi.org/10.1016/j.precamres.2012.08.005>
- Wally, N., Schneider, M., Thannesberger, J., Kastner, M. T., Bakonyi, T., Indik, S., Rattei, T., Bedarf, J., Hildebrand, F., Law, J., Jovel, J., & Steininger, C. (2019). Plasmid DNA contaminant in molecular reagents. *Scientific Reports*, 9(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-38733-1>
- Wang, C., Lin, G., Yan, T., Zheng, Z., Chen, B., & Sun, F. (2014). The cellular community in the intestine of the shrimp *Penaeus penicillatus* and its culture environments. *Fisheries Science*, 80(5), 1001–1007. <https://doi.org/10.1007/s12562-014-0765-3>
- Ward, T., Larson, J., Meulemans, J., Hillmann, B., Lynch, J., Sidiropoulos, D., Spear, J. R., Caporaso, G., Blekhan, R., Knight, R., Fink, R., & Knights, D. (2017). BugBase predicts organism-level microbiome phenotypes. *BioRxiv*, 133462. <https://doi.org/10.1101/133462>
- Warthmann, R., Lith, Y. V., Vasconcelos, C., McKenzie, J. A., & Karpoff, A. M. (2000). Bacterially induced dolomite precipitation in anoxic culture experiments. *Geology*, 28(12), 1091–1094. [https://doi.org/10.1130/0091-7613\(2000\)028<1091:BIDPIA>2.3.CO;2](https://doi.org/10.1130/0091-7613(2000)028<1091:BIDPIA>2.3.CO;2)
- Warthmann, R., Vasconcelos, C., Sass, H., & McKenzie, J. A. (2005). *Desulfovibrio brasiliensis* sp. nov., a moderate halophilic sulfate-reducing bacterium from Lagoa Vermelha (Brazil) mediating dolomite formation. *Extremophiles*, 9(3), 255–261. <https://doi.org/10.1007/s00792-005-0441-8>
- Weber, K. A., Achenbach, L. A., & Coates, J. D. (2006). Microorganisms pumping iron: Anaerobic microbial iron oxidation and reduction. *Nature Reviews Microbiology*, 4(10), 752–764. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1490>
- Weiner, S., & Dove, P. M. (2003). An Overview of biomineralization processes and the problem of the vital effect. *Reviews in mineralogy and geochemistry*, 54(1), 1–29. <https://doi.org/10.2113/0540001>
- Westall, F. (1999). The nature of fossil bacteria: A guide to the search for extraterrestrial life. *Journal of Geophysical Research E: Planets*, 104(E7), 16437–16451. <https://doi.org/10.1029/1998JE900051>
- Westall, F., de Wit, M. J., Dann, J., van der Gaast, S., de Ronde, C. E. J., & Gerneke, D. (2001). Early Archean fossil bacteria and biofilms in hydrothermally-influenced sediments from the Barberton greenstone belt, South Africa. *Precambrian Research*, 106(1–2), 93–116.
- Wexler, H. M. (2007). *Bacteroides*: The good, the bad, and the nitty-gritty. *Clinical Microbiology Reviews*, 20(4), 593–621. <https://doi.org/10.1128/CMR.00008-07>

- Weyrich, L. S., Farrer, A. G., Eisenhofer, R., Arriola, L. A., Young, J., Selway, C. A., Handsley-Davis, M., Adler, C. J., Breen, J., & Cooper, A. (2019). Laboratory contamination over time during low-biomass sample analysis. *Molecular Ecology Resources*, *19*(4), 982–996. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.13011>
- White, D. J. (1997). Dental calculus: recent insights into occurrence, formation, prevention, removal and oral health effects of supragingival and subgingival deposits. *European Journal of Oral Sciences*, *105*(5), 508–522. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0722.1997.tb00238.x>
- Wiemann, J., Crawford, J. M., & Briggs, D. E. G. (2020). Phylogenetic and physiological signals in metazoan fossil biomolecules. *Science Advances*, *6*(28), 1–11. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aba6883>
- Wiklund, T., & Dalsgaard, I. (1998). Occurrence and significance of atypical *Aeromonas salmonicida* in non-salmonid and salmonid fish species: A review. *Diseases of Aquatic Organisms*, *32*(1), 49–69. <https://doi.org/10.3354/dao032049>
- Wilby, P. R., & Martill, D. M. (1992). Fossil fish stomachs: A microenvironment for exceptional preservation. *Historical Biology*, *6*(1), 25–36. <https://doi.org/10.1080/10292389209380416>
- Wilby, P. R., Briggs, D. E. G., & Riou, B. (1996). Mineralization of soft-bodied invertebrates in a Jurassic metalliferous deposit. *Geology*, *24*(9), 847–850. [https://doi.org/10.1130/0091-7613\(1996\)024<0847:MOSBII>2.3.CO;2](https://doi.org/10.1130/0091-7613(1996)024<0847:MOSBII>2.3.CO;2)
- Williams, L. B., Metge, D. W., Eberl, D. D., Harvey, R. W., Turner, A. G., Prapaipong, P., & Poret-Peterson, A. T. (2011). What makes a natural clay antibacterial? *Environmental science & technology*, *45*(8), 3768–3773. <https://doi.org/10.1021/es1040688>
- Wilmeth, D. T., Johnson, H. A., Stamps, B. W., Berelson, W. M., Stevenson, B. S., Nunn, H. S., Grim, S. L., Dillon, M. L., Paradis, O., Corsetti, F. A., & Spear, J. R. (2018). Environmental and biological influences on carbonate precipitation within hot spring microbial mats in Little Hot Creek, CA. *Frontiers in Microbiology*, *9*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01464>
- Wilson, L. A., & Butterfield, N. J. (2014). Sediment effects on the preservation of Burgess Shale-Type compression fossils. *Palaios*, *29*(4), 145–154. <https://doi.org/10.2110/palo.2013.075>
- Wilson, W. W., Wade, M. M., Holman, S. C., & Champlin, F. R. (2001). Status of methods for assessing bacterial cell surface charge properties based on zeta potential measurements. *Journal of Microbiological Methods*, *43*(3), 153–164. [https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(00\)00224-4](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(00)00224-4)
- Winand, R., Bogaerts, B., Hoffman, S., Lefevre, L., Delvoeye, M., Van Braekel, J., Fu, Q., Roosens, N. H. C., De Keersmaecker, S. C. J., & Vanneste, K. (2020). Targeting the 16s rRNA gene for bacterial identification in complex mixed samples: Comparative evaluation of second (Illumina) and third (Oxford Nanopore Technologies) generation sequencing technologies. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(1), 1–22. <https://doi.org/10.3390/ijms21010298>
- Woese, C. R., & Fox, G. E. (1977). Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: The primary kingdoms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *74*(11), 5088–5090. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.11.5088>
- Wörner, S., & Pester, M. (2019). Microbial succession of anaerobic chitin degradation in freshwater sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, *85*(18), 1–13.
- Wu, K., & Cheng, L. (2015). *Ruminiclostridium*. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*, 1–11.
- Wu, Y. F., Xing, P., Liu, S., & Wu, Q. L. (2019). Enhanced microbial interactions and deterministic successions during anoxic decomposition of *Microcystis* biomass in lake sediment. *Frontiers in Microbiology*, *10*, 1–14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02474>

- Yang, F., Sun, J., Luo, H., Ren, H., Zhou, H., Lin, Y., Han, M., Chen, B., Liao, H., Brix, S., Li, J., Yang, H., Kristiansen, K., & Zhong, H. (2020). Assessment of fecal DNA extraction protocols for metagenomic studies. *GigaScience*, 9(7), 1–12. <https://doi.org/10.1093/gigascience/giaa071>
- Yoon, S. H., Ha, S. M., Kwon, S., Lim, J., Kim, Y., Seo, H., & Chun, J. (2017). Introducing EzBioCloud: A taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 67(5), 1613–1617. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001755>
- You, X., Sun, S., Zhu, J., Li, Q., Hu, W., & Dong, H. (2013). Microbially mediated dolomite in Cambrian stromatolites from the Tarim Basin, north-west China: Implications for the role of organic substrate on dolomite precipitation. *Terra Nova*, 25(5), 387–395. <https://doi.org/10.1111/ter.12048>
- Yuan, S., Cohen, D. B., Ravel, J., Abdo, Z., & Forney, L. J. (2012). Evaluation of methods for the extraction and purification of DNA from the human microbiome. *PLoS ONE*, 7(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033865>
- Zhang, M., Sun, Y., Chen, L., Cai, C., Qiao, F., Du, Z., & Li, E. (2016). Symbiotic bacteria in gills and guts of Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) differ from the free-living bacteria in water. *PLoS ONE*, 11(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0148135>
- Zhang, Z., Liu, J., Jin, X., Liu, C., Fan, C., Guo, L., & Liang, Y. (2020). Developmental, dietary, and geographical impacts on gut microbiota of red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*). *Microorganisms*, 8(9), 1376. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8091376>
- Zhao, B., Xing, P., & Wu, Q. L. (2017). Microbes participated in macrophyte leaf litters decomposition in freshwater habitat. *FEMS Microbiology Ecology*, 93(10), 1–15. <https://doi.org/10.1093/femsec/fix108>
- Zuo, K., Li, J., Xu, Q., Hu, C., Gao, Y., Chen, M., Hu, R., Liu, Y., Chi, H., Yin, Q., Cao, Y., Wang, P., Qin, Y., Liu, X., Zhong, J., Cai, J., Li, K., & Yang, X. (2019). Dysbiotic gut microbes may contribute to hypertension by limiting vitamin D production. *Clinical Cardiology*, 42(8), 710–719. <https://doi.org/10.1002/clc.23195>

Publikationen

Zeitschriftenartikel

- Janssen, K.***, Krasenbrink, J.*, Strangfeld, S., Kroheck, S., Josten, M., Engeser, M., & Bierbaum, G. (2021). Structural elucidation of the lantibiotic Pseudomycoicidin. *MDPI Antibiotics*. (in Vorbereitung)
- Mähler, B.*, **Janssen, K.***, Lagos, M., Lönartz, M., Rust, J., & Bierbaum, G. (2021). The decomposition of *Cambarellus diminutus* in lake-water and - sediment under different environmental conditions. (in Vorbereitung)
- Mähler, B., **Janssen, K.**, Tahoun, M., Tomaschek, F., Schellhorn, R., Müller, C. E., Bierbaum, G., & Rust, J. (2021). Adipocire formation in biofilms as a preliminary stage in soft tissue preservation. (in Vorbereitung)
- Janssen, K.***, Mahler, B.*, Bierbaum, G., Rust, J., & McCoy, V. E. (2021). The complex role of microbial metabolic activity in fossilization. *Biological Reviews*. <https://doi.org/10.1111/brv.12806>
- Janssen, K.***, Low, S. L.*, Wang, Y., Mu, Q., Bierbaum, G., & Gee, C. T. (2021). Elucidating biofilm diversity on water lily leaves through 16S rRNA amplicon analysis: Comparison of four DNA extraction kits. *Applications in Plant Sciences*, e11444. <https://doi.org/10.1002/aps3.11444>
- Mähler, B., **Janssen, K.**, Menneken, M., Tahoun, M., Lagos, M., Bierbaum, G., Müller, C. E., & Rust, J. (2020). Calcite precipitation forms crystal clusters and muscle mineralization during the decomposition of *Cambarellus diminutus* (Decapoda: Cambaridae) in freshwater. *Palaeontologia Electronica*, 23(3). <https://doi.org/10.26879/992>
- Peris, D.*, **Janssen, K.***, Barthel, H. J., Bierbaum, G., Delclòs, X., Peñalver, E., Solórzano-Kraemer, M. M., Jordal, B. H., & Rust, J. (2020). DNA from resin-embedded organisms: Past, present and future. *PLoS ONE*, 15(9), 1–21. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0239521>
- Gäb, F., Ballhaus, C., Stinnesbeck, E., Kral, A. G., **Janssen, K.**, & Bierbaum, G. (2020). Experimental taphonomy of fish - role of elevated pressure, salinity and pH. *Scientific Reports*, 10(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-64651-8>
- ### Vorträge
- Janssen, K.**, Mahler, B., Rust, J., Bierbaum, G. (2020). „The impact of bacterial activity on decay and fossilization of arthropods.” In oral presentation: 6th Group Meeting of DFG Research unit 2685 “Fossilization”, October 2020, Bonn, Germany
- Janssen, K.**, Mahler, B., Rust, J., Bierbaum, G. (2020). „The impact of bacterial activity on decay and fossilization of arthropods.” In oral presentation: 6th Group Meeting of DFG Research unit 2685 “Fossilization”, June 2020, Bonn, Germany
- Janssen, K.**, Mahler, B., Rust, J., Bierbaum, G. (2019). „The impact of bacterial activity on decay and fossilization of arthropods.” In oral presentation: 5th Group Meeting of DFG Research unit 2685 “Fossilization”, November 2019, Siegburg, Germany
- Janssen, K.**, Mahler, B., Rust, J., Bierbaum, G. (2019). „The impact of bacterial activity on decay and fossilization of arthropods.” In oral presentation: 4th Group Meeting of DFG Research unit 2685 “Fossilization”, May 2019, Rech, Germany
- Janssen, K.**, Mahler, B., Rust, J., Bierbaum, G. (2018). „The impact of bacterial activity on decay and fossilization of

Publikationen

arthropods.” In oral presentation: 3rd Group Meeting of DFG Research unit 2685 “Fossilization”, November 2018, Rech, Germany

Janssen, K., Mähler, B., Rust, J., Bierbaum, G. (2018). „The impact of bacterial activity on decay and fossilization of arthropods.” In oral presentation: 2nd Group Meeting of DFG Research unit 2685 “Fossilization”, May 2018, Siegburg, Germany

Poster

Janssen, K., Mähler, B., Rust, J., Bierbaum, G. (2020). „Are bacteria key players in decay and preservation processes.” In Poster presentation: Annual Conference of the Association for General and Applied Microbiology (VAAM), 8-10 March 2020, Leipzig, Germany.

Janssen, K., Mähler, B., Rust, J., Bierbaum, G. (2019). „The impact of bacterial activity on decay and fossilization of arthropods.” In Poster presentation: Annual Conference of the Association for General and Applied Microbiology (VAAM), 17-19 March 2019, Mainz, Germany.

Janssen, K., Steffens, U., Mähler, B., Rust, J., Bierbaum, G. (2018). „The impact of bacterial activity on decay and fossilization of arthropods.” In poster presentation: GeoBonn, 2-6 Sep 2018, Bonn, Germany.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich sowohl fachlich, als auch persönlich bei der Anfertigung der vorliegenden Arbeit unterstützt haben.

Ein großer Dank geht an **Prof. Dr. Gabriele Bierbaum**, die mir dieses ungewöhnliche Thema zur Verfügung gestellt und mir stets mit Rat und Tat zur Seite gestanden hat. Ihre persönliche Begeisterung für die Thematik und ihr unermüdlicher Zuspruch hat mich aus dem ein oder anderen Frustrationsloch geholt. Und nicht nur fachlich, sondern auch persönlich hat sie mich immer begleitet und mich nicht nur dazu motiviert mit dem Fahrrad zur Arbeit zu fahren, sondern auch mal mit offenem Ohr durch den Wald zu gehen.

Bei **Prof. Dr. Martin Sander** bedanke ich mich sowohl für die Übernahme des Zweitgutachtens als auch für die herzliche Aufnahme in die Forschergruppe und das ehrliche Interesse, das mir bei jedem Treffen entgegengebracht wurde.

Dr. Marianne Engeser und **Prof. Dr. Lukas Schreiber** danke ich dafür, dass sie als Mitglieder meiner Prüfungskommission meiner Arbeit Interesse entgegengebracht und mich am Tag meiner Prüfung unterstützt haben.

Der **Deutschen Forschungsgesellschaft** danke ich für die Finanzierung meines Projektes und der Möglichkeit mich nicht nur fachlich, sondern auch persönlich in verschiedensten Kursen weiterbilden zu können.

In diesem Zuge danke ich auch der gesamten **DFG Forschergruppe FOR 2685**, deren Teil ich innerhalb meines Projektes sein durfte. Durch die verschiedenen Fachgebiete habe ich Einblicke in Bereiche und Methodiken erhalten, die ich mir vorher nie hätte vorstellen können. Die interdisziplinäre Arbeit, insbesondere mit den Nachwuchswissenschaftler*innen, hat mich nachhaltig bereichert und meinen Horizont erweitert. Danke, für all die schönen Forschergruppentreffen - und den leckeren Wein! Vor allem danke ich hier **Jonas Barthel, Dr. Fabian Gäb, Anna Krahl, Dr. David Peris, Dr. Carole T. Gee** und **Shook Ling Low** für die tolle und unkomplizierte Zusammenarbeit. Liebe **Mara Lönartz**, danke dass du nie aufgehört hast in meinen RAMAN-Spektren etwas zu finden!

Ein besonderer Dank geht an **Bastian Mähler**, der mit mir meine Telefonierangst überwunden, mir immer frischen Salzkaramell-Tee gekocht und mir fachlich (Was passiert, wenn der Krebs noch lebt?) und vor allem menschlich immer zur Seite gestanden hat. Danke, dass du all meine Existenzkrisen, Entscheidungen und Aufreger abgefangen hast.

Natürlich danke ich allen Mitgliedern der **AG Bierbaum**, in der ich mich ab dem ersten Tag willkommen gefühlt habe. All den Laborblöckler*innen, Masterstudent*innen und Bachelorstudent*innen danke ich für die lustigen und interessanten Pausen, die wir zusammen hatten. **Mike Gajdiss** und **Dr. Ursula Steffens** danke ich für die schöne erste Zeit die wir miteinander verbracht haben.

Danksagung

Alina Dietrich war in den letzten Jahren die beste Laborpartnerin, die man sich hätte wünschen können und war immer für mich da - wortwörtlich, denn ich war insgesamt vielleicht 2 Tage ohne sie im Labor. Ich bin stolz, dass ich sie und **Michael Hort**, gemeinsam mit **Anne Schrötter** erfolgreich in den Bonner Karneval einführen konnte. **Michael**, danke für die tolle Konferenz in Mainz und alle Gespräche, die wir in den letzten 4 Jahren geführt haben.

Weiterer Dank geht an **Dominik Schuster**, der als mein 1. Betreuer im Masterpraktikum den Weg bis hierhin geebnet hat und **Katja Kehl**, die immer, wenn man sie braucht einen lustigen und motivierenden Spruch auf den Lippen und gemeinsam mit Dominik meinen ersten Spitznamen aufrechterhalten hat. Ich danke auch, **Christiane Szekat**, die mich bei allen Ideen unterstützt und stets den Überblick über alles im Labor behalten hat. Danke, dass du uns bei all dem Organisatorischen den Rücken freihältst und dich immer mit den Barcodes rumschlägst.

Bedanken möchte ich mich auch bei **Michaele Josten**, die nie das Interesse an Pseudomycoicidin verloren und uns immer mit Rat und vor allem Tat zur Seite gestanden hat. Ohne dich wäre dieses Projekt nie so weit gekommen. Ein weiteres Dankeschön geht an **Anna Schallenberg**, die immer ein offenes Ohr hatte und mit der ich viele schöne Gespräche - vor allem montagmorgens - führen konnte.

In den letzten Jahren haben mich zahlreiche Studentinnen auf meinem Weg unterstützt und mir vor allem bei meinem kleinen Herzensprojekt (man hat es nicht immer gemerkt) Pseudomycoicidin geholfen haben. Insbesondere danke ich hier **Julia Krasenbrink**, die in dem gemeinsamen Jahr eine echte Freundin geworden ist und mit der ich seitdem fachlich und persönlich durch verschiedenste Höhen und Tiefen gegangen bin. **Sarina Strangfeld** und **Sarah Kroheck** haben unglaubliche Arbeit geleistet, um endlich die Struktur von Pseudomycoicidin aufzuklären und mich regelmäßig im Labor zum Lachen zu bringen. Danke für eure ganze positive Energie!

Neben der AG Bierbaum, danke ich insbesondere **Franziska Lenz-Plens** und **Esther Sib**, die immer für ein lustiges Gespräch zu haben waren und mir all meine Isolate - egal zu welcher Tages- und Nachtzeit - mit dem MALDI-TOF/MS bestimmt haben.

Meinen Freunden, die mich zum Teil seit über 20 Jahren begleiten oder mir während des Studiums ans Herz gewachsen sind, möchte ich für die bedingungslose Präsenz und die Unterstützung während meines Studiums und in den vergangenen Jahren danken. Danke, dass ihr mir vor allem in schwierigen Momenten beigestanden und stets für die nötige Ablenkung gesorgt habt.

Der größte Dank geht an **meine gesamte Familie und besonders an meine Eltern**, die mich nicht nur finanziell, sondern vor allem persönlich immer unterstützt haben. Vielen Dank, dass ihr mich in all meinen Entscheidungen beraten und bestärkt habt und dass ihr mir das Gefühl gebt, alles meistern zu können. **Meiner Nichte und meinen Neffen** danke ich, dass sie mit ihrer Präsenz und ihrer Art so viel Spaß, Unbekümmertheit und Liebe in meinen Alltag bringen und mich Probleme vergessen machen.