

## **Abschlussbericht VibrioNet C2 (Förderkennzeichen 01KI1015B)**

### *Saisonalität von pathogenen Vibrionen in Seewasser, Plankton und Muscheln der Nord- und Ostsee*

Dr. Gunnar Gerdts, Alfred-Wegener-Institut Helmholtz Zentrum für Polar und Meeresforschung  
Biologische Anstalt Helgoland, Kurpromenade, 27483 Helgoland

#### **1. Motivation & Ziele (gemäß Antrag VibrioNet C2; Förderkennzeichen 01KI1015B)**

Der wissenschaftliche Beirat globale Umweltveränderungen (WBGU) der Deutschen Bundesregierung gibt an, dass die globalen Klima-Veränderungen bereits zu einem Anstieg der Oberflächen-Temperatur der Ozeane um ca. 1 °C geführt haben. Auch die Langzeitserie der Biologischen Anstalt Helgoland in der Deutschen Bucht an der Position „Kabeltonne“ (54 ° 11.3 ' N, 7 ° 54.0' O) zeigt, dass die Wassertemperatur der Nordsee seit 1962 bereits um 1.5 °C angestiegen ist [1]. Diese Erhöhung der Wassertemperatur könnte nun direkt das Wachstum von Vibrionen beeinflussen und damit zu einer nördlicheren Verbreitung pathogener Vibrio Spezies führen [2, 3].

Bis heute sind Studien über humanpathogene Vibrionen (z.B. *V. parahaemolyticus* oder *V. vulnificus*) in Nord Europa nur selten durchgeführt worden. [4-6], was auch darin begründet liegt, dass zumindest in Deutschland bislang Infektionen (*V. vulnificus*) nur sporadisch aufgetreten sind [7]. Gleichwohl belegen mehrere Studien, den starken Einfluss der Temperatur auf das Wachstum pathogener Vibrionen [8, 9]. Man darf daher annehmen, das auch humanpathogene Vibrionen sich bei einer Erhöhung der Temperatur sowohl in der Nordsee als auch in der Ostsee in der Zukunft verbreiten können. Da der Klimawandel alle trophischen Ebenen betreffen wird und weiterhin bekannt ist, dass Vibrionen sich an lebende Oberflächen anheften [10], muss hier ebenfalls einbezogen werden, inwiefern auch Prokaryonten/Eukaryonten Konsortien (z.B. mit Phytoplankton, Zooplankton) durch steigende Wassertemperaturen beeinflusst werden können. Bisher waren „Outbreaks“ pathogener *Vibrio* spp. (z.B. *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae*) eher ein Problem unterentwickelter Länder. Der Globale Wandel und die intensiv vernetzte Welt (Tourismus, Ballastwasser) werden in der Zukunft höchstwahrscheinlich zu einer intensiven Verbreitung potentiell pathogener *Vibrio* spp. führen. Daher ist die Analyse von potentiell pathogenen

*Vibrio* spp. Populationen und ihrer aktuellen und möglichen zukünftigen Nischen zweifelsohne nicht nur ein Thema der Dritten Welt, sondern ist auch für Industrieländer kalt gemäßigter Breiten -wie Deutschland- von hoher Bedeutung.

Aus den genannten Gründen ist in diesem wachsenden Problemfeld eine Evaluierung und Kopplung verschiedener empirischer, experimenteller, methodischer und statistischer Analysen notwendig, um eine Risikobewertung zu ermöglichen.

Ein großes Problem bei der Detektion spezifischer Vibrionen ist die große Ähnlichkeit der ribosomalen Gene (16S rDNA) eng verwandter Arten sowie deren enorme intraspezifische Diversität (*V. parahaemolyticus* and *V. alginolyticus*) [11]. Die meisten ökologischen Studien zu bakteriellen Gemeinschaften basieren auf kulturunabhängigen Analysen der ribosomalen RNA (z.B. FISH) oder DNA (z.B. DGGE). Auf Grund der oben erwähnten engen Verwandtschaft von Vibrionen (insbesondere *V. parahaemolyticus* and *V. alginolyticus* [12-14]) ist es daher hier wichtig, sowohl kulturabhängige als auch - unabhängige Methoden in einem polyphasischen Ansatz einzusetzen, um Identität und Diversität der Vibrionen detailliert erfassen zu können.

## **2. Ziele des TP C2**

- *Evaluierung eines Analyse Schemas für potentiell pathogene Vibrio spp. Populationen in der Deutschen Bucht*
- *Beschreibung des Vorkommens potentiell pathogener Vibrio spp. Populationen in Deutschen Gewässern*
- *Beschreibung und Bewertung von Umweltfaktoren, die das Auftreten von pathogenen Vibrio spp. in Deutschen Gewässern beeinflussen*
- *Abschätzung des zukünftigen Auftretens potentiell pathogener Vibrio spp. Populationen in Deutschen Gewässern in Abhängigkeit von der Klimaerwärmung*

## **3. Ergebnisse**

Im Rahmen des Vorhabens konnten wesentliche Ziele des Antrages erfolgreich bearbeitet werden. Der Schwerpunkt der Arbeiten lag primär im Aufbau einer umfangreichen Stammsammlung an Umweltstämmen und deren Charakterisierung mittels molekularbiologischer (u.A. *rpoB* Sequenzierung, Detektion von Virulenzgenen) und massenspektrometrischer Methoden (MALDI-TOF). Die Bearbeitung des zweiten Projekt-

Schwerpunktes, der im Bereich Monitoring und der Abschätzung des Einflusses von Umweltfaktoren auf potentiell pathogene *Vibrio* spp. Populationen lag, konnte nur teilweise bearbeitet werden, da im Projektzeitraum die Sommer-Wassertemperaturen in Nord- und Ostsee vergleichsweise niedrig lagen und damit das Auftreten von Vibrionen nicht begünstigt haben. Die Ergebnisse werden im Folgenden analog den formulierten Projekt-Zielen detailliert vorgestellt.

### **3.1 Evaluierung eines Analyse Schemas für potentiell pathogene *Vibrio* spp. Populationen in der Deutschen Bucht**

Im Rahmen des TP C2 kamen sowohl kulturabhängige, wie auch kulturunabhängige Methoden zum Einsatz. Diese sollten hinsichtlich einer Eignung für eine zukünftige Umweltüberwachung hinsichtlich *Vibrio* spp. evaluiert werden. Im Falle kulturabhängiger Methoden lag der Schwerpunkt zum einen im Aufbau einer umfangreichen Stammsammlung an Umweltisolaten und deren Charakterisierung. Zum anderen sollte geprüft werden, inwieweit „fast microbiology“ Methoden -wie z.B. MALDI-TOF- für Umwelt-Überwachungssysteme hinsichtlich potentiell pathogener *Vibrio* spp. nutzbar gemacht werden können. Für eine biogeographische Analyse der Ökotypen der wichtigsten potentiell humanpathogenen *Vibrio* spp. wurde ferner ein genomisches Fingerprinting (ERIC) eingesetzt. Ferner wurde überprüft inwiefern bereits in angereicherter Biomasse (APW Anreicherungen; Kolonien), -mithin ohne Isolierung- *Vibrio* spp. eindeutig nachgewiesen werden können (MALDI-TOF; DHPLC). Im Falle kulturunabhängiger Ansätze wurden die im Rahmen des Verbundprojektes von Q-Bioanalytik entwickelte QPCR kits (siehe **TP C9**) zum Nachweis von *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. vulnificus* und *V. cholerae* in natürlichen Wasserproben aus Nord- und Ostsee eingesetzt. Im Rahmen einer gemeinsamen VibrioNet Forschungsfahrt mit dem FS Heincke im Sommer 2012 wurden verschiedene im Rahmen von VibrioNet entwickelte Ansätze für die Detektion von potentiell humanpathogenen *Vibrio* spp. z.T. an Bord evaluiert (Darstellung unter 3.2).

**Vibrio spp. Stammsammlung.** Bis dato wurden 1408 Umweltisolate aus der Nord- und Ostsee sowie von der englischen Kanalküste in die Stammsammlung integriert. Isoliert wurden diese *Vibrio* spp. entweder aus Wasser, Plankton, Sediment oder Muscheln (u.A. während einer VibrioNet Forschungsfahrt mit dem FS Heincke im Jahre 2011 und eigener

Voruntersuchungen). Aufgenommen wurden weiterhin *Vibrio* spp. Isolate aus Sammlungen der für die Gewässerqualität zuständigen Landesuntersuchungsämter aus Schleswig-Holstein (ZE Medizinaluntersuchungsamt und Hygiene) , Niedersachsen (NLGA) und Mecklenburg Vorpommern (LAGUS), sowie vom britischen CEFAS, vom niederländischen Centre for Infectious Disease Control Netherlands und weitere Typstämme des DSMZ.

Tabelle 1 gibt eine Übersicht über den gegenwärtigen Umfang der Stammsammlung. Alle Isolate werden gegenwärtig in fl. Stickstoff gelagert (Microbank System).

**Tabelle 1:** VibrioNet TP C2 Stammsammlung

strain owner	No.	Sampling location	sample origin	sampling date
CEFAS <sup>1</sup>	23	South England	water, mussels, crabs	2001-2006
RIVM <sup>2</sup>	28	Netherlands	water	2009-2011
NLGA <sup>3</sup>	240	Lower Saxony, Germany	Water	2010-2011
LAGuS <sup>4</sup>	130	Mecklenburg-Vorpommern, Germany	Water	2010-2011
LAVES <sup>5</sup>	82	Lower Saxony, Germany	Mussels	?
(AWI <sup>6</sup> /UKSH <sup>7</sup> )	216	Schleswig-Holstein, Germany	Water	2011
AWI	110	North Sea, Kattegat, Baltic Sea	water, plankton, sediment	2011
AWI	207	Helgoland Roads	water, plankton, mussels	2008-2009
BfR <sup>8</sup>	7	(type strains)	Diverse	
TUD <sup>9</sup>	1	(Dresden)	clinical samples	2011
(BRHV <sup>10</sup> )	2	(Bremerhaven)	clinical samples	2012
DSMZ <sup>11</sup>	23	(type strains)	Diverse	

<sup>1</sup> Centre for Environment, Fisheries & Aquaculture Science (United Kingdom)

<sup>2</sup> Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu (Netherlands; National Institute for Public Health and the Environment)

<sup>3</sup> Niedersächsisches Landesgesundheitsamt (Germany; Governmental Institute of Public Health of Lower Saxony)

<sup>4</sup> Landesamt für Gesundheit und Soziales Mecklenburg-Vorpommern (Germany; Regional Office for Health and Social Affairs of Mecklenburg-Western Pomerania)

<sup>5</sup> Niedersächsischen Landesamtes für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (Germany; Lower Saxony State Office for Consumer Protection and Food Safety)

<sup>6</sup> Alfred-Wegener-Institut für Polar- und Meeresforschung (Germany; Alfred Wegener Institute for Polar and Marine Research)

<sup>7</sup> Universitätsklinikum Schleswig-Holstein (Germany; University Medical Center Schleswig-Holstein)

<sup>8</sup> Bundesinstitut für Risikobewertung (Germany; Federal Institute for Risk Assessment)

<sup>9</sup> Technische Universität Dresden (Germany, University of Dresden)

<sup>10</sup> Bremerhaven Hospital -Reinkenheide (Germany)

<sup>11</sup> Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (Germany; German Collection of Microorganisms and Cell Cultures)

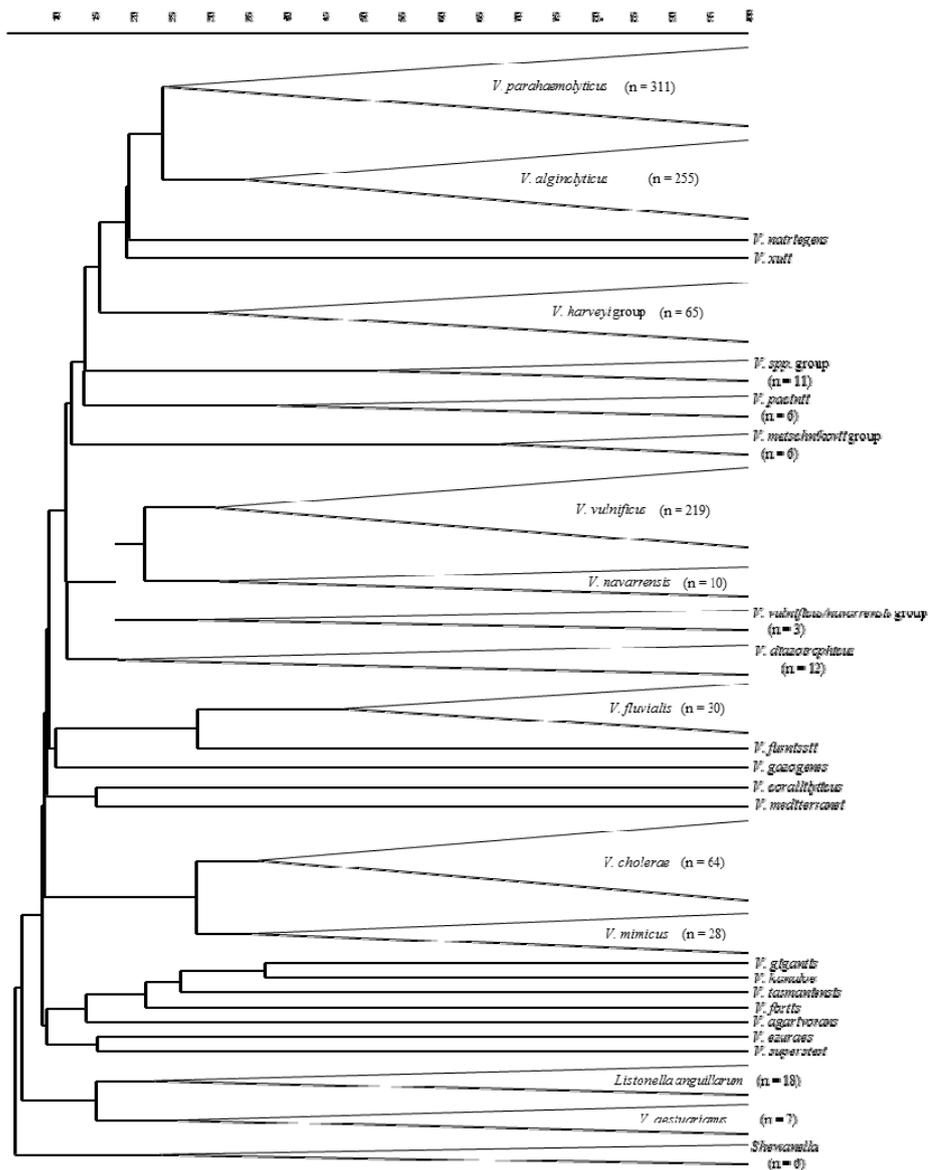
**Charakterisierung & Identifizierung von *Vibrio* spp.** Für die Identifikation potentiell pathogener *Vibrio* spp. wurde das von der Firma Bruker entwickelte Biotyper-System eingesetzt. Da das System vornehmlich Einsatz im klinischen Bereich findet, war (und ist) die Spektren-Datenbank auf klinische Erreger ausgerichtet, Einträge für Umwelt- bzw. Meeres-Bakterien sind kaum vorhanden. Trotz dieses Nachteils bietet das System sehr große Vorteile für eine schnelle Identifizierung neuer Isolate ohne aufwendige biochemische Tests oder molekularbiologische Techniken. Im **TP C2** wurde daher im Laufe des Projektzeitraumes die Datenbank mit neuen *Vibrio* spp. und Stämmen ständig erweitert und diese in der Mehrzahl der Fälle mittels *rpoB* Sequenzierung eindeutig phylogenetisch eingeordnet [15]. In der Datenbank VibrioBase liegen gegenwärtig MALDI-TOF Referenzspektren für 977 Spezies/Ökotypen vor [15]. Von nahezu allen dieser Spezies wurden *rpoB* Sequenzierungen durchgeführt, um die Spektren eindeutig referenzieren zu können. Die Datenbank wird als Supplement der Publikation Erler et. al. [15] der wissenschaftlichen Gemeinschaft frei zur Verfügung gestellt.

Ferner wurden für die Spezies *V. vulnificus*, *V. parahaemolyticus* und *V. cholerae* zur weiteren Absicherung der Ergebnisse, Spezies-spezifische PCR Nachweise durchgeführt (*toxR*) bzw. bei den letzteren beiden Spezies, das Auftreten von Virulenzgenen (*tdh*, *trh*, *Vctox*) überprüft [16]. Die Spezies-spezifischen *toxR* PCRs waren dabei in allen Fällen kohärent mit den Ergebnissen der *rpoB*-Sequenzierung (Phylogenie) und der MALDI-TOF Klassifizierung. Virulenzgene (nur *trH*) konnten nur in wenigen Ausnahmefällen nachgewiesen werden.

Tabelle 2 gibt einen Überblick über die in VibrioBase enthaltenen Spezies und der Anzahl der jeweiligen Stämme (Ökotypen) im Vergleich zur aktuellen Bruker Biotyper™ Datenbank. In Abbildung 1 ist ein Cluster Analyse (UPGMA) der Referenzspektren der in Vibriobase enthaltenen *Vibrio* spp. dargestellt. Es wird deutlich, dass auch eng verwandte Spezies, wie z.B. *V. parahaemolyticus* und *V. alginolyticus* eindeutig differenzierbar sind.

**Tabelle 2** Überblick über die in VibrioBase enthaltenen Spezies und der Anzahl der jeweiligen Stämme (Ökotypen) im Vergleich zur aktuellen Bruker Biotyper™ Datenbank.

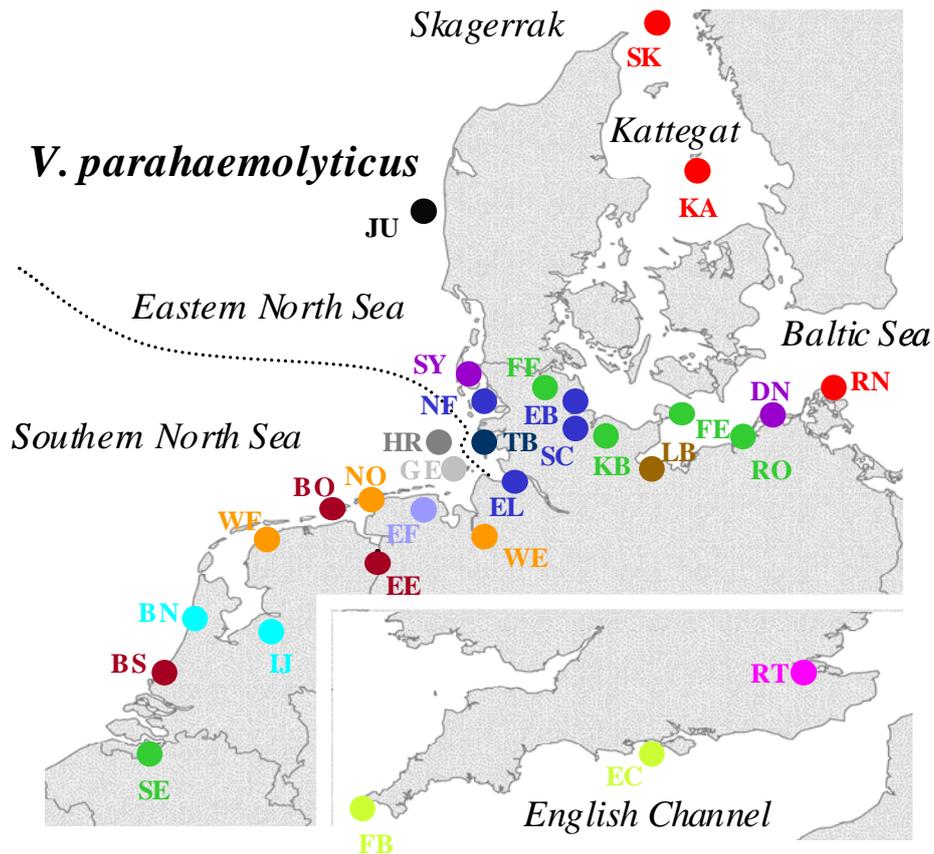
MALDI-TOF MS species cluster	Biotyper™ main spectra	VibrioBase main spectra
<i>Listonella anguillarum</i>	7	18
<i>V. aestuarianus</i>	1	7
<i>V. agarivorans</i>	1	1
<i>V. alginolyticus</i>	4	252
<i>V. cholera</i>	0	64
<i>V. coralliilyticus</i>	1	1
<i>V. diazotrophicus</i>	2	12
<i>V. ezurae</i>	1	1
<i>V. fluvialis</i>	3	29
<i>V. fortis</i>	1	1
<i>V. furnissii</i>	2	1
<i>V. gazogenes</i>	1	1
<i>V. gigantis</i>	1	1
<i>V. harveyi/campbellii</i>	4	44
<i>V. kanaloae</i>	1	1
<i>V. mediterranei</i>	1	1
<i>V. mimicus</i>	1	27
<i>V. natriegens</i>	1	1
<i>V. navarrensis</i>	1	9
<i>V. parahaemolyticus</i>	7	306
<i>V. superstes</i>	1	1
<i>V. tasmaniensis</i>	1	1
<i>V. vulnificus</i>	5	216
<i>V. xuii</i>	1	1
Total	49	997



**Abbildung 1** Cluster Analyse (UPGMA) der VibrioBase MALDI TOF Referenzspektren basierend auf dem Jaccard Index [15]

**Genomische Fingerprints von Vibrio spp. (Biogeographie).** Die im Rahmen des Projektes analysierten Isolate stammten aus zwei, hinsichtlich der Salinität, fundamental unterschiedlichen Ökosystemen. Mithin konnte prinzipiell erwartet werden, dass die unterschiedlichen ökologischen Nischen, auch durch unterschiedliche Spezies bzw. Populationen besetzt sein könnten. Der Fokus der Untersuchungen lag dabei auf den drei potentiell humanpathogenen Vibrio Spezies *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* und *V. cholerae*. Insgesamt wurden 472 Stämme mit Hilfe der genomischen Fingerprint-Technik ERIC [17] analysiert. Dabei wurden die resultierenden Elektropherogramme in band-

matching Tabellen umgewandelt und statistisch ausgewertet. Für die Definition der Genotypen/Ökotypen wurde zunächst eine 80%ige Ähnlichkeit der Profile herangezogen. Beispielhaft ist in Abbildung 2 die Verteilung der *V. parahaemolyticus* Genotypen/Ökotypen im Untersuchungsgebiet dargestellt. Auffallend ist, dass wie zu erwarten, eine Trennung der Nord- und Ostsee Populationen beobachtet werden konnte, aber dass auch eindeutige kleinräumige Differenzierungen auftraten. Interessant ist hier die Trennung von Populationen entlang des Elbe-Urstromtales in der Deutschen Bucht, die wir auf das hydrographische Regime zurückführen. Insgesamt verdeutlicht die Analyse die enorme intraspezifische Diversität der drei untersuchten Spezies. Im Hinblick auf das Vorhaben, wurde, wie auch schon im Falle der bereits publizierten MALDI-TOF Datenbank VibrioBase, eine weitere BioNumerics basierte Datenbank erstellt (VibERIC), die es gestattet in zukünftigen Untersuchungen z.B. die Dispersion einzelner Populationen im Hinblick auf ein sich veränderndes hydrographisches System (Klimawandel) zu verfolgen bzw. ggf. invasive Populationen zu adressieren. So konnten wir in aktuellen Untersuchungen bereits eindeutig nachweisen, dass Mikroplastik-Partikel in der Nord- und Ostsee als Vektoren für potentiell humanpathogene Vibrionen fungieren können (Publikation in Vorbereitung).

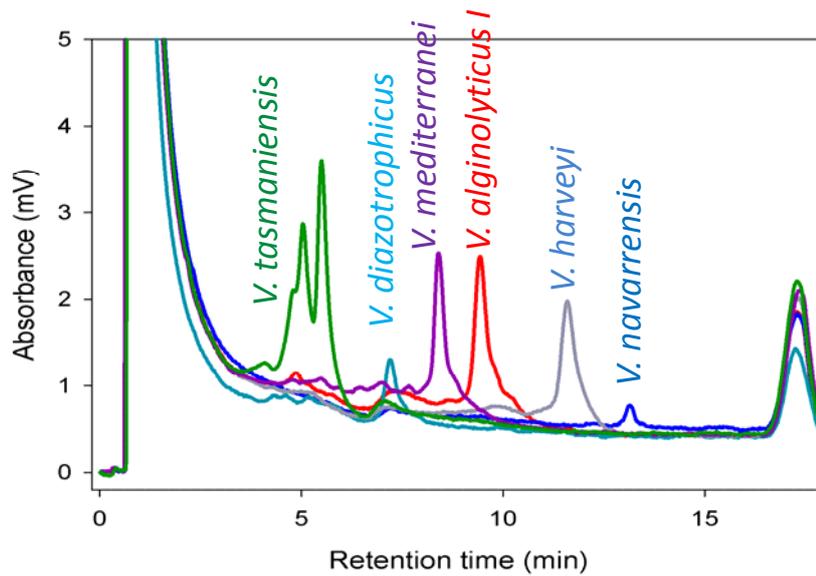


**Abbildung 2:** Verteilung von verschiedenen *V. parahaemolyticus* Genotypen/Ökotypen in Nord- und Ostsee [18]

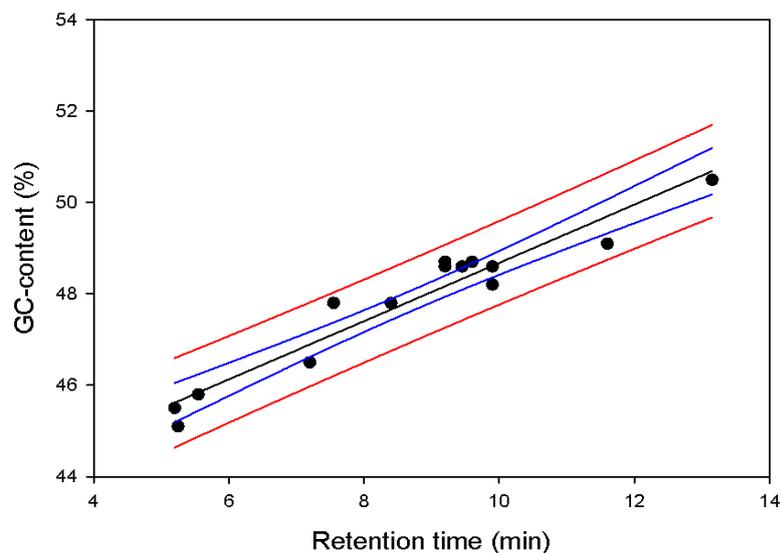
**Charakterisierung & Identifizierung von *Vibrio* spp. in angereicherter Biomasse.** Bei der Bewertung einzelner methodischer Ansätze hinsichtlich der Eignung für ein zukünftiges *Vibrio* spp. Monitoring, müssen die Praxistauglichkeit, die Dauer der Analyse und die grundsätzlichen methodenbedingten Vor- und Nachteile in Betracht gezogen werden (um einen Befund richtig einordnen zu können). Klassische mikrobiologische Ansätze, die auf der Isolierung von Bakterien und deren Identifizierung mit Hilfe biochemischer oder molekularbiologischer Verfahren beruhen, sind z.T. extrem zeitaufwendig. Weiterhin ist ein Befund abhängig vom verwandten Nährmedium bzw. vom physiologischen Status des Ziel-Organismus. Im Falle von *Vibrio* spp. sei hier das „viable but not culturable“ (VBNC) Phänomen genannt [19], welches dazu führt, dass lebensfähige Vibrionen zwar vorhanden, aber nicht auf Festmedium kultivierbar sind. Kulturunabhängige Verfahren die in der Mehrzahl der Fälle auf direkten molekularbiologischen Verfahren beruhen (PCR, QPCR), sind deutlich weniger zeitaufwendig, haben aber den Nachteil, dass sowohl ungünstige target/non-target Verhältnisse, wie auch die Präsenz von PCR-inhibierenden Substanzen in

einer Probe, Befunde extrem verfälschen können. Hierauf wird im Einzelnen unter 3.2 eingegangen. Da für die Detektion von wärmeliebenden *Vibrio* spp. häufig vor der eigentlichen Isolierung von Kolonien eine Vor-Anreicherung in APW (Alkaline Peptone Water) erfolgt, lag es nahe, Methoden zu evaluieren, die es ggf. gestatten, bereits anhand von APW Anreicherungen, eine Analyse der in der Probe befindlichen *Vibrio* spp. vorzunehmen. Im Rahmen des **TP C2** wurden hier zwei methodische Ansätze verfolgt bzw. geprüft, die grundsätzlich auf den anhand der Isolate durchgeführten Sequenz- (*rpoB*) und MALDI-TOF Analysen beruhen.

***rpoB*-DHPLC.** Die Methodik der DHPLC (Denaturing High Pressure Liquid Chromatography) wird im klinischen Bereich in der Regel für die Detektion von Mutationen (SNPs) eingesetzt [20], kann aber ebenso für die Sequenz-abhängige Auftrennung von Amplikons (z.B. 16S-rDNA) verwandt werden [21, 22]. Auf der Basis der in **TP C2** generierten *rpoB* Sequenzen der Isolate, sowie weiterer via Genbank integrierter Sequenzen, wurden im Rahmen einer Masterarbeit [23] mit Hilfe des Softwarepaketes ARB (<http://www.arb-silva.de/>) verschiedene universelle *Vibrio* spp. Primer hinsichtlich Exklusivität/Inklusivität und Schmelzverhalten *in silico* generiert und *in vitro* evaluiert (PCR, DHPLC). Neben Einzel-Analysen wurden hier auch unterschiedlich komplexe Mischungen verschiedener *Vibrio* spp. untersucht. Es zeigte sich, dass *rpoB* Amplikons mittels DHPLC grundsätzlich aufgetrennt werden können (siehe Abbildung 3), eng verwandte *Vibrio* Spezies aber nicht, da die Auftrennung direkt mit dem GC Gehalt des Amplikons, nicht aber -wie z.B. im Falle der DGGE- auf Sequenzvariation (Schmelzdomänen) basiert [24] (siehe Abbildung 4). Mithin erscheint zum gegenwärtigen Zeitpunkt, dieser Ansatz ungeeignet, für eine Analyse von APW-Anreicherungen.



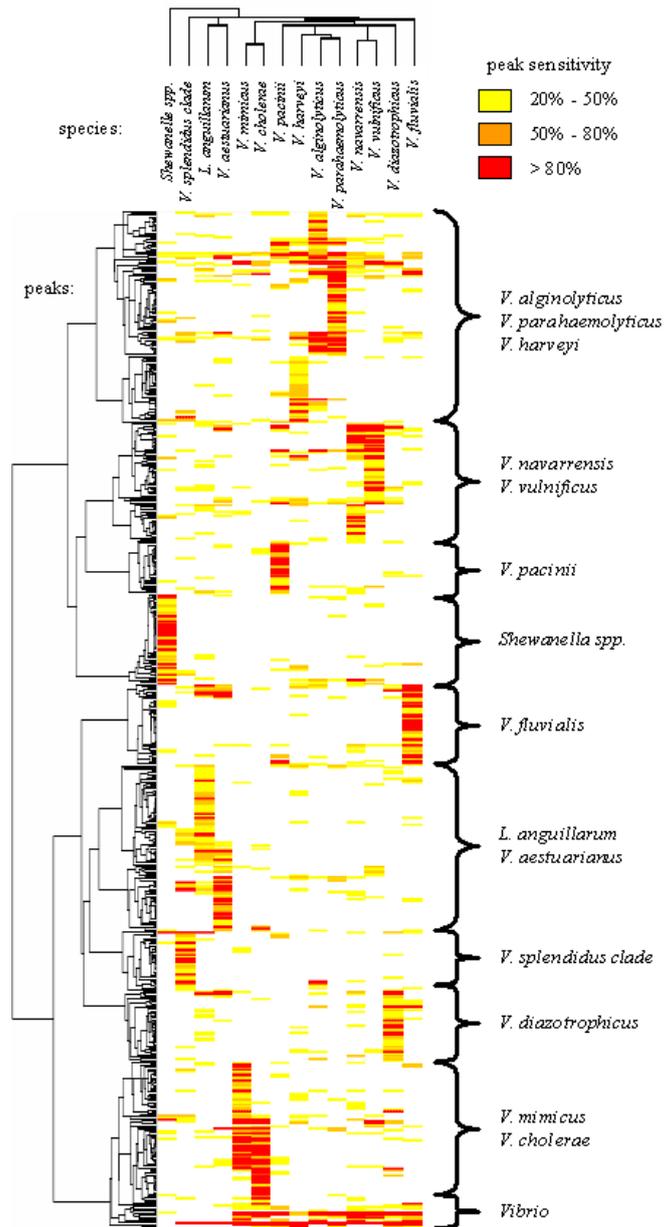
**Abbildung 3** DHPLC Chromatogramme von *rpoB*-Amplifikaten ausgewählter *Vibrio* spp. [23]



**Abbildung 4** DHPLC Retentionszeit des Peaks ausgewählter *Vibrio* spp. *rpoB*-Amplifikate und errechnete GC Gehalte der Amplifikate [23]

**MALDI-TOF Biomarker.** Neben dem zunehmenden Einsatz massenspektrometrischer Methoden in der klinischen Diagnostik von Isolaten [25], werden zunehmend auch Ansätze verfolgt, zumindest gering-diverse Proben, wie z.B. Urin [26] oder Blut [27] direkt mittels MALDI-TOF hinsichtlich des Vorhandenseins spezifischer Erreger zu untersuchen. Da prinzipiell davon auszugehen ist, dass APW Anreicherungen sowohl selektiv (hinsichtlich *Vibrio* spp.), als auch geringer divers als die ursprüngliche Probe sind, wurde auch im

Rahmen von **TP C2**, in einem zur *rpoB*-DHPLC Studie vergleichbaren Ansatz geprüft, ob Spezies-spezifische MALDI-TOF Biomarker in unterschiedlich diversen APW Anreicherungen nachgewiesen werden können. Dass Spezies-spezifische MALDI TOF Biomarker existieren, konnte anhand von *in silico* Analysen bereits zweifelsfrei nachgewiesen werden [15, 28-30]. Im Rahmen einer Masterarbeit [31] sollte dies nun mit einem Schwerpunkt auf potentiell humanpathogene *Vibrio* spp., *in vitro* überprüft werden. Basierend auf den in VibrioBase hinterlegten Referenzspektren wurden zunächst alle Spektren hinsichtlich Exklusivität/Inklusivität einzelner Massen *in silico* analysiert und solche Massen adressiert, die einzeln oder in Kombination, als Spezies-spezifisch angesehen werden können. In Abbildung 5 ist eine Clusteranalyse aller Massen hinsichtlich der Sensitivität für einzelne Spezies-Komplexe dargestellt. In einem weiteren Schritt wurden nun von insgesamt 10 *Vibrio* Spezies Binärmischungen aller Kombinationen hergestellt, mittels MALDI-TOF vermessen und anhand der adressierten Biomarker analysiert. In fast allen Fällen konnten die Spezies eindeutig identifiziert werden. Im Falle von komplexeren Mischungen (5, 10) gelang dies nicht für alle im Versuch eingesetzten Spezies. Auffällig war aber, dass auch in komplexen Versuchsansätzen mit wenigen dominierenden Spezies (ungleiche Mischungsansätze), diese nachgewiesen werden konnten. Wenngleich die Diversität in einfachen APW Anreicherungen sehr wahrscheinlich zu hoch ist, um alle vorhandenen *Vibrio* Spezies mittels MALDI-TOF Biomarker Analyse eindeutig adressieren zu können, besteht die valide Möglichkeit, durch die Verwendung eines MPN-APW (Most Probable Number) Ansatzes, zumindest die dominanten Spezies eindeutig identifizieren zu können. Dies wäre eine interessante Alternative zu den bislang eingesetzten MPN-PCR Methoden (Zitat), da die Analyse mittels MALDI-TOF einen erheblichen Zeitgewinn bringen würde.



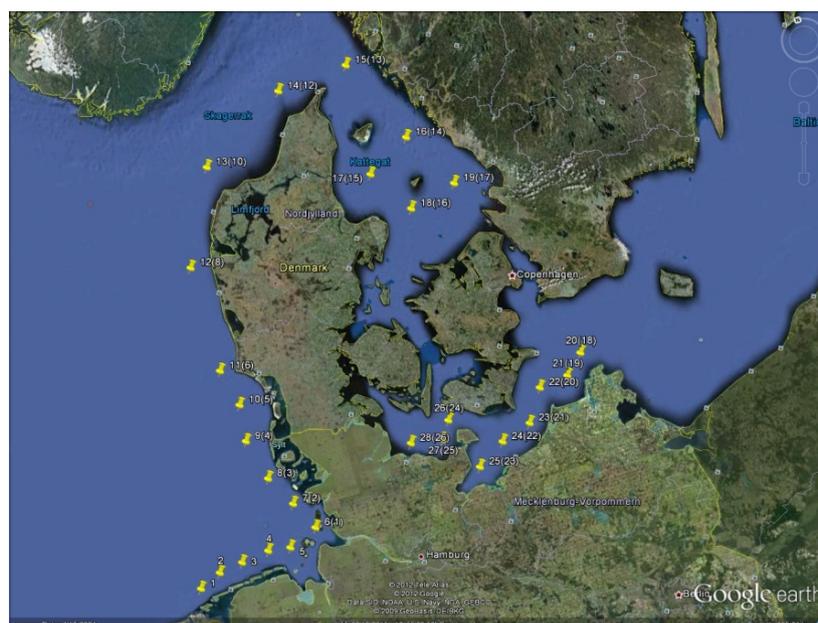
**Abbildung 5:** 2D Cluster Analyse (average distance) ausgewählter *Vibrio* spp. und ihrer MALDI-TOF Protein-Massen. Massen mit unterschiedlicher Sensitivität für einzelne Spezies sind farblich hervorgehoben [30]

### 3.2 Beschreibung des Vorkommens potentiell pathogener *Vibrio* spp. Populationen in Deutschen Gewässern

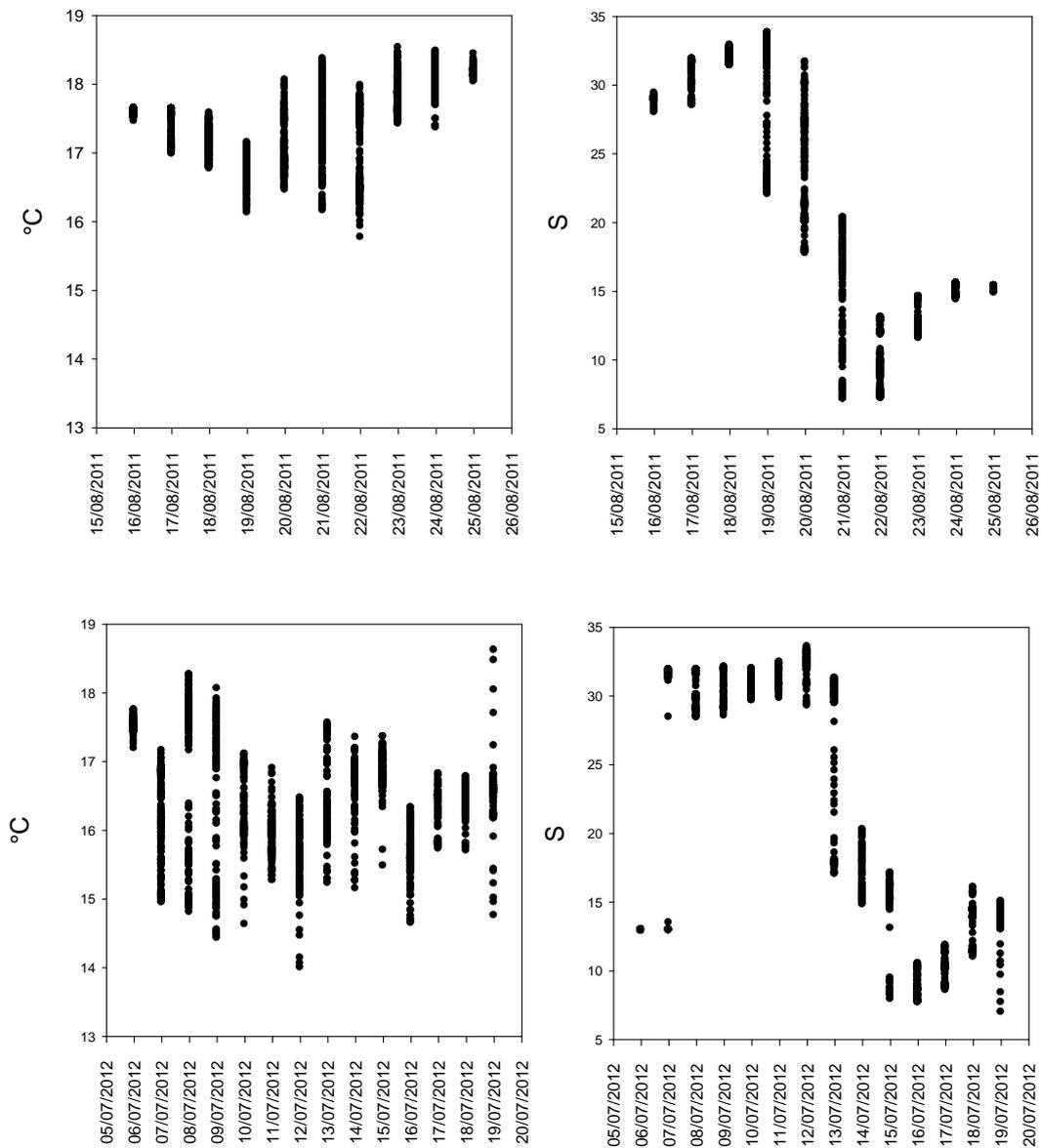
Auf Initiative des Projektantragstellers wurde seitens des MSGFG Schleswig Holstein das ZE Medizinaluntersuchungsamt und Hygiene beauftragt, im Sommer 2011, im Rahmen der behördlichen Badewasseruntersuchungen, die Proben zusätzlich hinsichtlich *Vibrio* spp. zu

untersuchen. Die Isolate wurden dem **TP C2** zur Verfügung gestellt. Die Kampagnen wurden in den darauf folgenden Jahren fortgeführt.

Im Rahmen des Projektes wurden zwei VibrioNet Forschungsfahrten mit dem FS Heincke in die Küstengewässer der Nord- und Ostsee jeweils im Sommer der Jahre 2011 und 2012 durchgeführt. Abbildung 6 zeigt die Lage der Stationen in Nord- und Ostsee der Forschungsfahrt im Sommer 2012 (im Wesentlichen identisch mit der Lage der Stationen bei der vorherigen Fahrt). Während die Fahrt 2011 primär auf die Isolierung neuer Umweltisolate aus diversen Ökosystemkompartimenten (Wasser, Zooplankton, Phytoplankton, Sediment) ausgerichtet war, sollten im Sommer 2012 verschiedene im Rahmen von VibrioNet entwickelte Ansätze für die Detektion von potentiell humanpathogenen *Vibrio* spp. z.T. an Bord evaluiert werden. Die Forschungsfahrt wurde in Kooperation mit den **TPs C2, C4, C6** und **C9** durchgeführt. Auf beiden Forschungsfahrten wurden ozeanographische Daten (Temperatur, Salzgehalt, Sauerstoff, Chlorophyll) mit Hilfe einer sogenannten CTD Sonde aufgenommen. Die exakte GPS Position jeder Station wurde notiert. Die Wassertemperaturen lagen während der Forschungsfahrt im Jahre 2011 zwischen 16 °C - 18.5 °C und 2012 zwischen 13 °C - 18 °C. Damit für die Jahreszeit auf jeweils relativ niedrigem Niveau. Die Salinität variierte auf beiden Forschungsfahrten zwischen 6S und 34 S. Abbildung 7 zeigt eine Darstellung der durchfahrenen Wasserkörper (repräsentiert als °C und S) für beide Forschungsfahrten beginnend an der ostfriesischen Küste, der Westküste Dänemarks bis zum Skagerrak, Kattegat und der Ostsee bis Rügen (analog zu den aufsteigenden Stationsnummern in Abbildung 6)



**Abbildung 6** Untersuchungsgebiet der Forschungsfahrten in den Sommern 2011 und 2012



**Abbildung 7** Wassertemperatur und Salinität während der Forschungsfahrten in den Sommern 2011 und 2012

Oberflächenwasser-Proben wurden mit einer CTD Sonde, Zooplankton-Proben mit einem CALCOFI Netz (300  $\mu\text{m}$ ), Phytoplankton-Proben mit einem Handnetz (20  $\mu\text{m}$ ) und Sedimentproben mit einem VanVeen-Greifer genommen.

Während der Forschungsfahrt 2011 wurden die auf Membranfilter (0.45 µm) aufgebrachte Proben in APW vorinkubiert (37°C, 24 h), danach auf CHROMagar™ Vibrio ausgestrichen und nach erneuter Inkubation (37°C, 24 h), *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae* und *V. vulnificus* Kolonien gemäß dem Farbschema des Herstellers isoliert. Ziel war es hier, die *Vibrio* spp. Stammsammlung grundsätzlich zu erweitern.

Die gemeinsame VibrioNet Forschungsfahrt 2012 hatte im Gegensatz zur vorherigen Fahrt das Ziel, potentiell humanpathogene *Vibrio* spp. in den jeweiligen Proben auch zu quantifizieren. Hierzu wurde im Falle kulturabhängiger Methoden unterschiedliche Aliquots (100 ml, 50 ml, 5 ml, 1 ml, 0.1 ml; triplicates) der jeweiligen Proben auf Membranfilter (0.45 µm) und diese direkt auf CHROMagar™ Vibrio inkubiert (37°C, 24 h). Nach Inkubation wurden einzeln stehende Kolonien analog des Farbschemas (siehe oben) gepickt, in Reaktionsgefäße mit 50%S 2216E Medium überführt, nach erneuter Inkubation (37°C, 24h) zentrifugiert und das Pellet für die spätere Messung mit dem MALDI-TOF Biotyper-System eingefroren (Mikro-Kulturen).

Im Falle kulturunabhängiger Methoden wurden Aliquots der jeweiligen Proben erneut auf Membranfilter filtriert. Von diesen Filtern wurde direkt DNA extrahiert (**TP C9**; Q-Bio kit). Weiterhin wurde im Laufe der Forschungsfahrt entschieden, weitere Membranfilter in APW zu inkubieren und auch von der so angereicherten Biomasse, DNA zu extrahieren. Alle DNA Extrakte wurden mit zwei unterschiedlichen Q-PCR Geräten und zwei unterschiedlichen Q-PCR-Systemen analysiert. System 1 (**TP C4**): *V. parahaemolyticus* VP1332 (binding component ABC transporter); *V. cholerae hlyA* (nonclassical hemolysine) & *V. vulnificus vvhA* (cytolysine). System 2 (**TP C9**): *V. alginolyticus* exoprotease A gene; *V. cholerae* exoprotease A gene; *V. parahaemolyticus* hemolysin gene & *V. vulnificus* cytolysin gene. Weiterhin wurden die DNA-Extrakte mit Hilfe eines vom **TP C6** entwickelten Vibrio-Microarrays analysiert (siehe Abschlussbericht **TP C6**). Insgesamt konnten in 64 Proben erfolgreich die adressierten *Vibrio* Spezies nachgewiesen werden (siehe Tabelle 3).

**Tabelle 3** Q-PCR Nachweis verschiedener *Vibrio* spp. in unterschiedlichen Proben der Forschungsfahrt im Sommer 2012

	<i>V. chol</i>	<i>V. para</i>	<i>V. vulni</i>	<i>V. algi</i>
Seewasser	0	2	10	2
Seewasser, APW	0	2	9	5
Phytoplankton	0	2	3	0
Phytoplankton, APW	0	0	11	7
Zooplankton	1	0	4	1
Zooplankton, APW	0	5	9	6
$\Sigma$	1	11	46	21

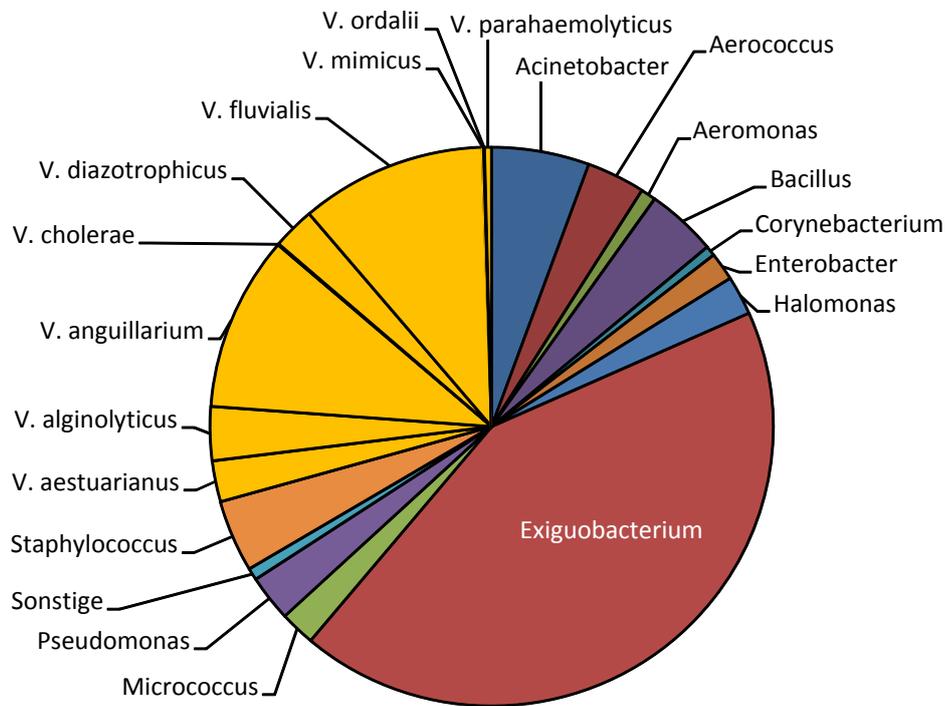
*V. chol*: *V. cholerae*; *V. para*: *V. parahaemolyticus*; *V. vulni*: *V.*

*vulnificus*; *V. algi*: *V. alginolyticus*; APW: Alkaline Peptone Water

Nach der Forschungsfahrt wurden alle Mikrokulturen mit Hilfe des MALDI-TOF Biotyper-Systems auf Helgoland vermessen und anhand der Biotyper- und VibrioBase Datenbank identifiziert. Insgesamt konnten 84% der 2055 während der Forschungsfahrt angelegten Mikrokulturen erfolgreich identifiziert werden:

- Nur 29 % der gefundenen Spezies waren Vibrionen
- 40 % der Spezies in Phytoplankton-Proben waren Vibrionen, hauptsächlich *V. fluvialis*, *V. anguillarum*, *V. diazotrophicus* und *V. aestuarianus*
- Insgesamt konnten nur 7 *V. parahaemolyticus* identifiziert werden (2 x Wasser ; 5 x Zooplankton)
- *V. vulnificus* und *V. cholerae* waren nicht vorhanden
- 43 % der gefundenen Spezies wurden als Exiguobacterium identifiziert

Abbildung 8 zeigt eine Übersicht, über die Spezies, die erfolgreich identifiziert werden konnten.



**Abbildung 8** Übersicht über die Spezies, die in Mikroturen der Forschungsfahrt Sommer 2012 erfolgreich identifiziert werden konnten (N = 1726)

Mithin ergibt sich für die Ergebnisse der Forschungsfahrt im Sommer 2012 eine extrem unklare Befundlage. Obwohl die Q-PCR Ergebnisse auf das Vorhandensein *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* und im Einzelfall *V. cholerae* hindeuten, kann dies im Hinblick auf den durchgeführten kulturabhängigen Ansatz nicht bestätigt werden. Im Gegensatz zur vorherigen Forschungsfahrt wurden die Proben ohne APW Voranreicherung direkt auf CHROMagar™ Vibrio aufgebracht. Dies könnte darauf hindeuten, dass ohne vorherige Vor-Selektion bei marinen Proben das verwendete Medium nicht geeignet ist. Da es kaum Studien zur Verwendung von CHROMagar™ Vibrio im marinen (Hochsee) Bereich gibt, kann an dieser Stelle keine weitere Einschätzung des Befundes erfolgen. Interessanterweise führte die Verwendung des Mediums in einem vergleichbaren Ansatz in der in 2011 durchgeführten Studie des ZE Medizinaluntersuchungsamt und Hygiene, zur erfolgreichen Isolierung der adressierten Erreger. Allerdings wurden in letzterem Fall die Proben direkt am Strand genommen und sind somit hinsichtlich der gesamten Wasserchemie kaum vergleichbar. Aufgrund der unklaren Befundlage wurde im Frühjahr 2013 anhand von in einem anderen Zusammenhang während der Forschungsfahrt im Sommer 2012 genommenen Proben, eine erneute Q-PCR Analyse aller beprobten Stationen (insgesamt 28)

durchgeführt. Diese Proben wurden während der Forschungsfahrt sequentiell über 10 µm, 3 µm und 0.2 µm filtriert und stellen mit jeweils 10 L Filtrationsvolumen (gegenüber dem 1 L Ansatz) eine repräsentativere Probe dar. Ferner wurde, ebenfalls im Gegensatz zur Forschungsfahrt, hier ein vom **TP C9** weiterentwickeltes QPCR-Primer-System eingesetzt, welches in dieser Form auch Eingang in die innerhalb des Verbundes durchgeführten Ring-Versuche gefunden hat. Überraschenderweise ergab sich nun erneut ein von den vorherigen Befunden abweichendes Bild. In insgesamt drei Proben konnte *V. cholerae* nachgewiesen werden (1 x 0.2 µm; 2 x 3 µm) und nur in zwei, *V. alginolyticus* (beide 10 µm). Weder *V. parahaemolyticus*, noch *V. vulnificus* konnten detektiert werden. Betrachtet man parallel dazu die Ergebnisse, der Ansatz-internen Kontroll-Reaktionen fällt auf, dass Proben der 0.2 µm Fraktion keine, der 3 µm Fraktion, zum grossen Teil und Proben der 10 µm Fraktion, fast alle, PCR Inhibitoren enthalten haben. Mithin ergibt sich weder für die hier eingesetzten kulturabhängigen, noch für die kulturunabhängigen Analyse-Methoden ein „bias-freies“ Bild der Belastung der untersuchten Gewässer mit *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae* und *V. vulnificus*.

### **3.3 & 3.4 Beschreibung und Bewertung von Umweltfaktoren, die das Auftreten von pathogenen *Vibrio* spp. in Deutschen Gewässern beeinflussen.**

#### **Abschätzung des zukünftigen Auftretens potentiell pathogener *Vibrio* spp. Populationen in Deutschen Gewässern in Abhängigkeit von der Klimaerwärmung**

Aufgrund der im Projektzeitraum relativ niedrigen Wassertemperaturen, muss konstatiert werden, dass das Wachstum der adressierten *Vibrio* spp. nicht begünstigt wurde, was grundsätzliche Aussagen über den weiteren Einfluss von Umweltfaktoren erschwert. In einer im Vorwege von VibrioNet durchgeführten Studie konnten wir aber bereits zeigen, dass an der Helgoländer Reede, das Wachstum der Vibrionen (als Gesamtzellzahl ermittelt über FISH) über den Term

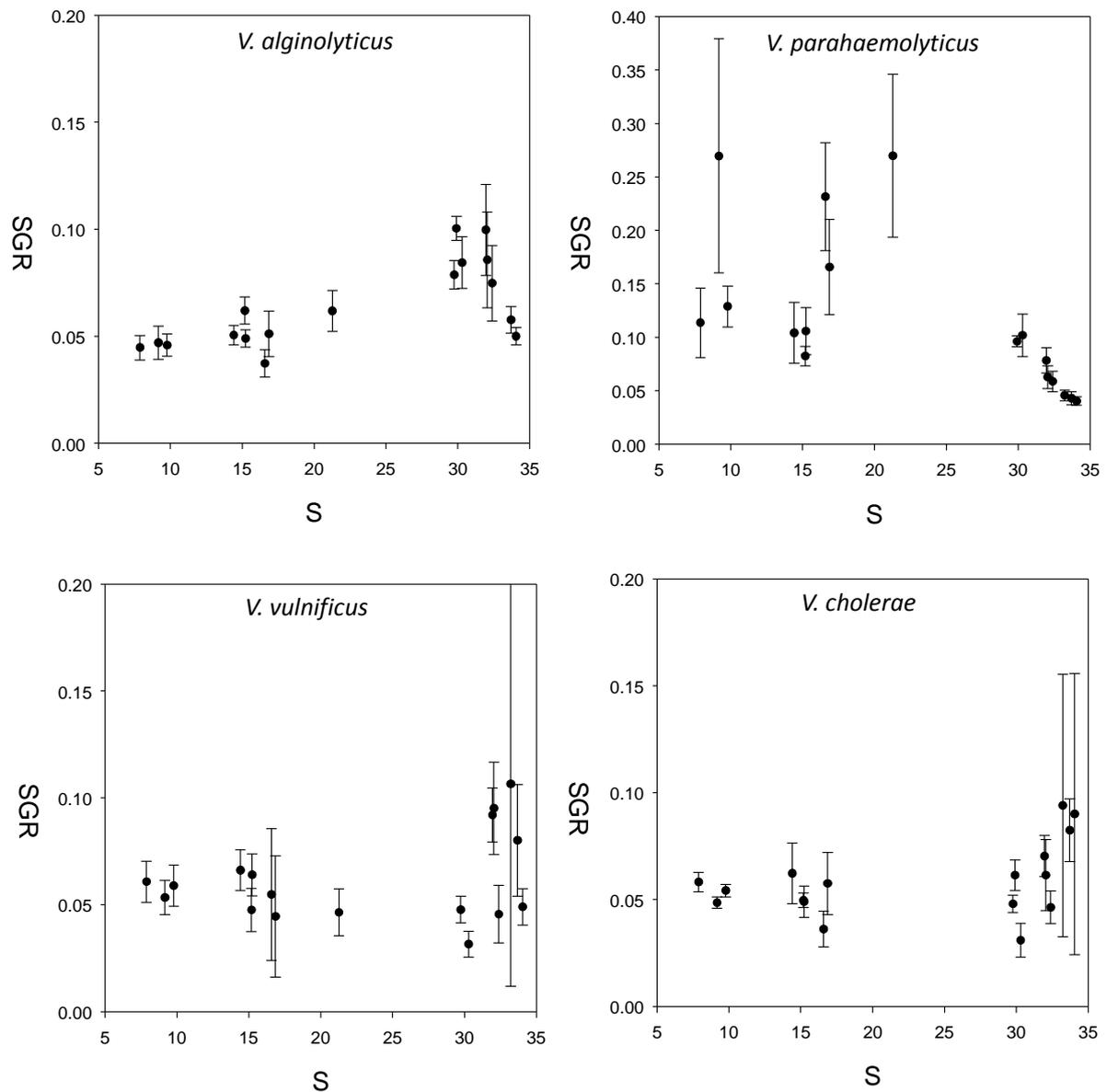
$$Vibrio\ spp. = 9.575 - (0.183 * S) + (0.054 * ^\circ C) - (0.839 * PO_4) - (0.033 * Secchi)$$

beschrieben werden kann [32]. Potentiell humanpathogene Vibrionen (nur *V. parahaemolyticus*) wurden dabei meist nur in den Sommermonaten in Wasser, Zooplankton,

Phytoplankton oder Muschelproben gefunden [33]. Eine numerische Auswertung der während der Forschungsfahrt im Sommer 2012 erhobenen bakteriologischen Daten und deren Abgleich mit Umweltfaktoren kann nicht vorgenommen werden, da weder die eingesetzten kulturunabhängigen, noch die kulturabhängigen Ansätze, eindeutige Ergebnisse geliefert haben. Dies verdeutlicht erneut die Notwendigkeit weiterer Studien in temperenten Gewässern auch über längere Zeiträume, um solar-planetare Zyklen mit zu berücksichtigen [34]. Im Gegensatz zu den Jahren 2011 und 2012 lagen die Wassertemperaturen in 2013 und 2014 deutlich höher. Für 2014 wird angenommen, dass es das bislang wärmste Jahr seit Beginn der Temperaturlaufzeichnungen werden wird.

Alternativ zu dem im Antrag vorgeschlagenen Vorgehen, wurde daher eine *in vitro* Studie durchgeführt. Dazu wurden während der Forschungsfahrt im Sommer 2012 genommene Wasserproben verwendet, die noch an Bord steril filtriert und anschließend eingefroren wurden. Im Labor wurden die Proben zunächst pasteurisiert (Abtötung von Grazern; Inaktivierung von Phagen) und anschließend jeweils entweder mit *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *V. cholerae* und *V. alginolyticus* Isolaten inokuliert ( $10^2$  Zellen/ml). Alle eingesetzten Isolate wurden während der Forschungsfahrt im Sommer 2011 aus dem Gebiet Skagerrak/Kattegat gewonnen. Die Versuchsansätze wurden in Folge in dreier Parallelen bei *in situ* Temperatur inkubiert ( $15,6 \pm 1,3$  °C), das Zellwachstum wurde mittels Durchfluss-Zytometrie (Anfärbung mit Sybr Green I) ermittelt. Die aufgenommenen Wuchskurven wurden analog dem Vorgehen von Vital et al. [35] ausgewertet und verschiedene Wachstumsparameter errechnet (u.A. lag-time, Wachstumsrate). In Abbildung 9 sind die errechneten standardisierten Wachstumsraten der 4 Spezies gegen die gemessenen Salinitäten der einzelnen Proben aufgetragen. *V. alginolyticus*, als z.T. hoch abundantes Meerwasserbakterium in temperenten Gewässern, zeigt dabei mit zunehmendem Salzgehalt ansteigende Wachstumsraten, was prinzipiell so erwartet werden konnte. Erst ab einer Salinität von  $\sim 30$  S kommt es erneut zu einem Absinken der Wachstumsrate. Überraschend ist hingegen das Verhalten von *V. parahaemolyticus*. Häufig werden *V. parahaemolyticus* und *V. alginolyticus* parallel aus denselben Wasserproben isoliert, mithin war ein vergleichbares Wachstums-Verhalten zu erwarten gewesen. *V. parahaemolyticus* zeigte aber im Vergleich, deutlich höhere Wachstumsraten auch bei niedrigeren Salinitäten. Im Vergleich mit allen anderen im Versuch eingesetzten Spezies konnten hier die höchsten Wachstumsraten ermittelt werden. Die Wachstumsraten von *V. cholerae* und *V. vulnificus*

schwankten über den untersuchten Salinitätsbereich erheblich. Obwohl die Salinitäts-Optima der beiden Keime prinzipiell deutlich im niedrigen Bereich liegen, konnten im Versuch auch bei höherer Salinität relativ hohe Wachstumsraten ermittelt werden. Dies deutet darauf hin, dass noch weitere Faktoren -außer der Salinität- eine wichtige Rolle in der Populationsdynamik von *Vibrio* spp. im marinen Milieu eine Rolle spielen, die in der vorliegenden Studie nicht erfasst wurde. Weiterhin erklärt die Studie ggf. die z.T. untypischen Befunde in Deutschen Küstengewässern (Präsenz eines Erregers außerhalb der Nische). Grundsätzlich bestünde aber hier die Möglichkeit, im Falle einer optimierten Wasseranalytik (z.B. hinsichtlich Aminosäuren, Zucker), die Wachstumsmodelle besser parametrisieren zu können. Dies könnte die Chance bieten, die so ermittelten Wachstumsparameter mit Ökosystem-Modellen zu koppeln, um so eine zeitliche und räumliche Risikoabschätzung für Deutsche Küstengewässer hinsichtlich der Belastung mit potentiell humanpathogenen *Vibrio* spp. vornehmen zu können



**Abbildung 9** Darstellung der Wachstumsrate (SGR) für *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* und *V. cholerae* in Wasserproben unterschiedlicher Salinität [36]

#### 4. Literatur

1. Wiltshire KH, Manly BFJ (2004) The warming trend at Helgoland Roads, North Sea: phytoplankton response. *Helgol Mar Res* 58: 269-273.
2. Paz S, Bisharat N, Paz E, Kidar O, Cohen D (2007) Climate change and the emergence of *Vibrio vulnificus* disease in Israel. *Environmental Research* 103: 390-396.
3. Colwell R (1996) Global climate and infectious disease: the cholera paradigm. *Science* 274: 2025-2031.
4. Eiler A, Johansson M, Bertilsson S (2006) Environmental influences on *Vibrio* populations in northern temperate and boreal coastal waters (Baltic and Skagerrak Seas). *Appl Environ Microbiol* 72: 6004-6011.

5. Ellingsen A, Jørgensen H, Wagley S, Monshaugen M, Rørvik L (2008) Genetic diversity among Norwegian *Vibrio parahaemolyticus*. J Appl Microbiol 105: 2195-2202.
6. Lhafi SK, Kühne M (2007) Occurrence of *Vibrio* spp. in blue mussels (*Mytilus edulis*) from the German Wadden Sea. International Journal of Food Microbiology 116: 297-300.
7. Frank C, Littman M, Alpers K, Hallauer J (2006) *Vibrio vulnificus* wound infections after contact with the Baltic Sea, Germany. Euro Surveill 11.
8. Motes ML, DePaola A, Cook DW, Veazey JE, Hunsucker JC, Garthright WE, Blodgett RJ, Chirtel SJ (1998) Influence of Water Temperature and Salinity on *Vibrio vulnificus* in Northern Gulf and Atlantic Coast Oysters (*Crassostrea virginica*). Appl Environ Microbiol 64: 1459-1465.
9. Kaspar CW, Tamplin ML (1993) Effects of temperature and salinity on the survival of *Vibrio vulnificus* in seawater and shellfish. Appl Environ Microbiol 59: 2425-2429.
10. Heidelberg JF, Heidelberg, K.B., Colwell, R.R. (2002) Bacteria of the g-Subclass Proteobacteria Associated with Zooplankton in Chesapeake Bay. Applied and Environmental Microbiology 68: 5498-5507.
11. Thompson FL, Iida T, Jean Swings J (2004) Biodiversity of Vibrios. Microbiology and Molecular Biology Reviews 68: 1092-2172.
12. Robert-Pillot A, Guenole A, Fournier JM (2002) Usefulness of R72H PCR assay for differentiation between *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio alginolyticus* species: validation by DNA-DNA hybridization. Fems Microbiology Letters 215: 1-6.
13. Kita-Tsukamoto K, Oyaizu H, Nanba K, Simidu U (1993) Phylogenetic Relationships of Marine Bacteria, Mainly Members of the Family Vibrionaceae, Determined on the Basis of 16S rRNA Sequences. Int J Syst Bact 43: 8-19.
14. Xie ZY, Hu CQ, Chen C, Zhang LP, Ren CH (2005) Investigation of seven *Vibrio* virulence genes among *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio parahaemolyticus* strains from the coastal mariculture systems in Guangdong, China. Letters in Applied Microbiology 41: 202-207.
15. Erler R, Wichels A, Heinemeyer E-A, Hauk G, Hippelein M, Torres Reyes N, Gerdt G (2014) VibrioBase: a MALDI-TOF MS database for fast identification of *Vibrio* spp. that are potentially pathogenic in humans. Systematic and Applied Microbiology (accepted).
16. Böer S, Heinemeyer E-A, Luden K, Erler R, Gerdt G, Janssen F, Brennholt N (2013) Temporal and Spatial Distribution Patterns of Potentially Pathogenic *Vibrio* spp. at Recreational Beaches of the German North Sea. Microbial Ecology 65: 1052-1067.
17. Keymer DP, Lam LH, Boehm AB (2009) Biogeographic Patterns in Genomic Diversity among a Large Collection of *Vibrio cholerae* Isolates. Applied and Environmental Microbiology 75: 1658-1666.
18. Erler, R, Wichels A, Dlugosch L, Gerdt G. (in prep) Biogeographical mapping of *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* and *V. vulnificus* populations in the North and Baltic Seas using ERIC-PCR genotyping.

19. Oliver JD (2005) The Viable but Nonculturable State in Bacteria. *The Journal of Microbiology* 43: 93-100.
20. Wolford J, Blunt D, Ballecer C, Prochazka M (2000) High-throughput SNP detection by using DNA pooling and denaturing high performance liquid chromatography (DHPLC). *Human genetics* 107: 483-487.
21. Goldenberg O, Herrmann S, Adam T, Marjoram G, Hong G, Gobel UB, Graf B (2005) Use of denaturing high-performance liquid chromatography for rapid detection and identification of seven *Candida* species. *Journal of Clinical Microbiology* 43: 5912-5915.
22. Goldenberg O, Herrmann S, Marjoram G, Noyer-Weidner M, Hong G, Bereswill S, Gobel UB (2007) Molecular monitoring of the intestinal flora by denaturing high performance liquid chromatography. *Journal of Microbiological Methods* 68: 94-105.
23. Nadja Lückheide (2013) Characterization of potentially pathogenic *Vibrio* spp. by rpoB-DHPLC (Denaturing High Performance Liquid Chromatography). Master thesis. Ruhr University Bochum
24. Muyzer G, Hottenträger S, Teske A, Wawer C (1995) Denaturing Gradient Gel Electrophoresis of PCR-Amplified 16S rDNA - A New Molecular Approach to Analyse the Genetic Diversity of Mixed Microbial Communities. *Molecular Microbial Ecology Manual*, vol. 3.4.4, pp. 1-22.
25. Maier T, Kostrzewa M (2007) Fast and reliable MALDI-TOF MS-based microorganism identification. *Chem. Today* 25:68-71.
26. Ferreira L, Sánchez-Juanes F, González-Ávila M, Cembrero-Fuciños D, Herrero-Hernández A, González-Buitrago JM, Muñoz-Bellido JL (2010) Direct identification of urinary tract pathogens from urine samples by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Journal of Clinical Microbiology* 48: 2110-2115.
27. Yan Y, He Y, Maier T, Quinn C, Shi G, Li H, Stratton CW, Kostrzewa M, Tang Y-W (2011) Improved identification of yeast species directly from positive blood culture media by combining Sepsityper specimen processing and Microflex analysis with the matrix-assisted laser desorption ionization Biotyper system. *Journal of Clinical Microbiology* 49: 2528-2532.
28. Hazen TH, Martinez RJ, Chen Y, Lafon PC, Garrett NM, Parsons MB, Bopp CA, Sullards MC, Sobecky PA (2009) Rapid Identification of *Vibrio parahaemolyticus* by Whole-Cell Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry. *Appl Environ Microbiol* 75: 6745-6756.
29. Dieckmann R, Strauch E, Alter T (2010) Rapid identification and characterization of *Vibrio* species using whole-cell MALDI-TOF mass spectrometry. *Journal of Applied Microbiology* 109: 199-211.
30. Erler R, Wichels A, Hartmann I, Gerdt G (in prep) Effective species identification of *Vibrio* spp. using mass spectrometric peaks as potential biomarkers
31. Hartmann I (2014) Identification of proteomic biomarkers for potential pathogenic *Vibrio* spp. by MALDI-TOF mass spectrometry. Master thesis. Technische Universität Darmstadt.

32. Oberbeckmann S, Fuchs B, Meiners M, Wichels A, Wiltshire K, Gerds G (2012) Seasonal Dynamics and Modeling of a *Vibrio* Community in Coastal Waters of the North Sea. *Microbial Ecology* 63: 543-551. doi: 10.1007/s00248-011-9990-9
33. Oberbeckmann S, Wichels A, Wiltshire K, Gerds G (2011) Occurrence of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio alginolyticus* in the German Bight over a seasonal cycle. *Antonie Van Leeuwenhoek* 100: 291-307.
34. Friis-Christensen E, Lassen K (1991) Length of the Solar Cycle: An Indicator of Solar Activity Closely Associated with Climate. *Science* 254: 698-700.
35. Vital M, Stucki D, Egli T, Hammes F (2010) Evaluating the Growth Potential of Pathogenic Bacteria in Water. *Applied and Environmental Microbiology* 76: 6477-6484.
36. Schierhorn T (2013). Ermittlung von in vitro Wachstumsraten potentiell pathogener *Vibrio* spp. mittels Durchflusssytometrie. Master thesis. Carl von Ossietzky Universität Oldenburg.

## 5. Publikationen im Rahmen von VibrioNet TP C2

Erlor R, Wichels A, Heinemeyer E-A, Hauk G, Hippelein M, Torres Reyes N, Gerds G (2014) VibrioBase: a MALDI-TOF MS database for fast identification of *Vibrio* spp. that are potentially pathogenic in humans. *Systematic and Applied Microbiology* (accepted)

Urmersbach S, Alter T, Koralage MS, Sperling L, Gerds G, Messelhäusser U, & Huehn S (2014). Population analysis of *Vibrio parahaemolyticus* originating from different geographical regions demonstrates a high genetic diversity. *BMC microbiology*, 14(1), 59

Böer S, Heinemeyer E-A, Luden K, Erlor R, Gerds G, Janssen F, Brennholt N (2013) Temporal and Spatial Distribution Patterns of Potentially Pathogenic *Vibrio* spp. at Recreational Beaches of the German North Sea. *Microbial Ecology* 65: 1052-1067

Erlor R, Wichels A, Dlugosch L, Gerds G. (in prep) Biogeographical mapping of *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* and *V. vulnificus* populations in the North and Baltic Seas using ERIC-PCR genotyping

Erlor R, Wichels A, Hartmann I, Gerds G (in prep) Effective species identification of *Vibrio* spp. using mass spectrometric peaks as potential biomarkers

## Berichtsblatt

1. ISBN oder ISSN	2. Berichtsart Abschlussbericht
3a. Titel des Berichts Saisonalität von pathogenen Vibrionen in Seewasser, Plankton und Muscheln der Nord- und Ostsee (VibrioNet TP C2)	
3b. Titel der Publikation	
4a. Autoren des Berichts (Name, Vorname(n)) Gerds, Gunnar	5. Abschlussdatum des Vorhabens 28.02.2014
	6. Veröffentlichungsdatum 27.10.2014
4b. Autoren der Publikation (Name, Vorname(n))	7. Form der Publikation Bericht
	8. Durchführende Institution(en) (Name, Adresse)  Alfred Wegener Institute Helmholtz Centre for polar and marine research Am Handelshafen 12 27570 Bremerhaven
13. Fördernde Institution (Name, Adresse)  Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF)  53170 Bonn	9. Ber. Nr. Durchführende Institution
	10. Förderkennzeichen *) 01K11015B
	11a. Seitenzahl Bericht 25
	11b. Seitenzahl Publikation
	12. Literaturangaben 36
16. Zusätzliche Angaben	14. Tabellen 3
	15. Abbildungen 9
	17. Vorgelegt bei (Titel, Ort, Datum) Projekträger im Deutschen Zentrum für Luft- und Raumfahrt e.V., 27.10.2014
18. Kurzfassung Die Globale Erwärmung als Folge des Klimawandels führt durch die Erwärmung der Gewässer auch zu einer Vergrößerung der Nischen für mesophile Vibrio Arten. Der Klimawandel hat deshalb einen direkten Einfluss auf das Wachstum der Vibrionen. Mithin ist anzunehmen, dass es dadurch auch zu einer Ausbreitung der pathogenen Vibrionen in nördlichere Regionen kommen wird. Unsere Forschung im Rahmen von VibrioNet schließt hier die Wissenslücken insbesondere bzgl. der Populationsstrukturen verschiedener relevanter Vibrio Arten in der Deutschen Bucht. Eine Hauptaufgabe im Unter-Projekt C2 war der Aufbau einer Stammsammlung von <i>Vibrio</i> spp. gekoppelt an eine Datenbank. Diese Datenbank ist die Basis für die Klassifizierung/Identifizierung von <i>Vibrio</i> spp. im Rahmen von VibrioNet aber auch perspektivisch für zukünftige Monitoring Programme. Bisher wurden zu diesem Zweck 1408 <i>Vibrio</i> spp. Stämme aus verschiedenen Quellen in unserer Sammlung implementiert und in Flüssigstickstoff konserviert. Detaillierte Analysen der Stämme wurden auf die potenziell humanpathogenen Arten <i>V. parahaemolyticus</i> , <i>V. vulnificus</i> und <i>V. cholera</i> focussiert, weitere Vibrio Arten wurden einbezogen, wenn es aus Vergleichsgründen nötig war. Insgesamt wurden von 997 Stämmen MALDI-TOF Referenz Spektren generiert. Außerdem wurden als weitere Identifizierungsparameter zu allen Spektren die entsprechenden rpoB Sequenzen dieser Stämme zugeordnet. Die MALDI-TOF Datenbank VibrioBase wurde veröffentlicht und ist der wissenschaftlichen Gemeinschaft frei zugänglich (als Teil einer Publikation, online über den Verlag). Im Sommer 2011/2012 fanden 2 Forschungsfahrten in enger Kooperation und unter Beteiligung der anderen VibrioNet Partner in der Nord- und Ostsee statt. Die kulturunabhängige Quantifizierung von <i>Vibrio</i> spp. in Wasserproben und Plankton wurden durch kulturabhängige Methoden ergänzt. Allerdings waren die Ergebnisse uneinheitlich. Da die Wassertemperaturen 2011 und auch 2012 vergleichsweise niedrig waren, können eher stochastische als deterministische Effekte die Populationsstruktur und/oder die Dynamik der untersuchten Vibrionen überlagert haben.	
19. Schlagwörter Pathogene, Klimawandel, MALDI-TOF	
20. Verlag	21. Preis

\*) Auf das Förderkennzeichen des BMBF soll auch in der Veröffentlichung hingewiesen werden.

## Document Control Sheet

1. ISBN or ISSN	2. Type of Report Final report	
3a. Report Title Seasonality of pathogenic <i>Vibrio</i> spp. in seawater, plankton and shellfish of the North- and Baltic Sea (VibrioNet TP C2)		
3b. Title of Publication		
4a. Author(s) of the Report (Family Name, First Name(s)) Gerds, Gunnar	5. End of Project 28.02.2014	
	6. Publication Date 27.10.2014	
4b. Author(s) of the Publication (Family Name, First Name(s))	7. Form of Publication Report	
	9. Originator's Report No.	
8. Performing Organization(s) (Name, Address)  Alfred Wegener Institute Helmholtz Centre for polar and marine research Am Handelshafen 12 27570 Bremerhaven	10. Reference No. 01KI1015B	
	11a. No. of Pages Report 25	
	11b. No. of Pages Publication	
	12. No. of References 36	
13. Sponsoring Agency (Name, Address)  Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF)  53170 Bonn	14. No. of Tables 3	
	15. No. of Figures 9	
	16. Supplementary Notes	
17. Presented at (Title, Place, Date) Projekträger im Deutschen Zentrum für Luft- und Raumfahrt e.V., 27.10.2014		
18. Abstract  Global warming leads to rising water temperatures and therefore expanded niches for mesophilic <i>Vibrio</i> spp.. Climate change could have therefore direct influence on the growth of <i>Vibrio</i> spp. and might also contribute to a more northerly geographic dispersal of pathogenic <i>Vibrio</i> spp.. Our aim was to close this gap of knowledge by brief analyses of <i>Vibrio</i> spp. populations in German coastal waters and of the biotic and abiotic environmental factors influencing abundance and diversity of <i>Vibrio</i> spp. One of the most prominent aims in subproject C2 was the generation of a <i>Vibrio</i> spp. strain collection and data base as a backbone for classification/identification of <i>Vibrio</i> spp. in VibrioNet and future environmental surveillance programs. Currently 1408 strains from several sources are implemented in our collection and stored in liquid nitrogen. For further analyses we focused on <i>V. parahaemolyticus</i> , <i>V. vulnificus</i> and <i>V. cholera</i> but included other species if necessary. We selected in total 997 strains from our VibrioNet collection for generating MALDI-TOF reference spectra. All spectra were assigned to unique <i>rpoB</i> sequences of the strains. The MALDI TOF database VibrioBase was published and is freely accessible for the scientific community (as part of the publication). Quantification and identification of <i>Vibrio</i> spp. in seawater or plankton, was performed by culture-dependent as far as culture-independent methods on two research cruises. In principal, the targeted <i>Vibrio</i> spp. could be detected but the results were inconsistent. We assume, that due to comparably low summer seawater temperatures in 2011 and 2012, stochastic rather than deterministic effects might have influenced the population structure or dynamic of the addressed <i>Vibrio</i> spp.		
19. Keywords Pathogens, Climate Change, MALDI-TOF		
20. Publisher	21. Price	