

Abschlussbericht

MiningImpact – Environmental Impacts and Risks of Deep-Sea Mining

Zuwendungsempfänger: Senckenberg Gesellschaft für Naturforschung, Frankfurt am Main

Förderkennzeichen: 03F0812E

Vorhabenbezeichnung: RaBiMo – Rapid Bio-Monitoring

Laufzeit des Vorhabens: 1.8.2018 – 28.2.2022



Gefördert vom Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt beim Autor



I.	Kurze Darstellung	5
1.	Ursprüngliche Aufgabenstellung	5
2.	Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde	5
3.	Planung und Ablauf des Vorhabens	5
4.	Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde.....	6
5.	Zusammenarbeit mit anderen Stellen.....	6
6.	Literatur.....	7
II.	Eingehende Darstellung	9
1.	der im Rahmen des Vorhabens durchgeführten Arbeiten,.....	9
a)	Aufbau einer Referenzbibliothek von DNA-Barcodes	9
b)	Meiofauna untersucht mit MALDI-TOF MS.....	10
c)	Ergebnisse zum Dredge Experiment.....	12
d)	Untersuchung der Meiofauna im Gebiet des Kollektor-Tests mit Metabarcoding.....	16
e)	Morphologische Untersuchung der Meiofauna im BGR-Testgebiet des Kollektors	21
f)	Verbreitungsmodelle der Meio- und Megafauna	22
g)	Literatur	25
2.	der wichtigsten Positionen des zahlenmäßigen Nachweises.....	26
3.	der Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit	27
4.	des voraussichtlichen Nutzens	27
h)	Wirtschaftlicher Nutzen	27
i)	Wissenschaftlich- technischer Nutzen	27
5.	des während der Durchführung des Vorhabens dem ZE bekannt gewordenen Fortschritts auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen.....	27
6.	der erfolgten oder geplanten Veröffentlichungen des Ergebnisses	28
a)	Artikel in internationalen Fachzeitschriften.....	28
b)	Vorträge und Poster bei internationalen Konferenzen und Instituten.....	30
c)	Berichte	30

I. Kurze Darstellung

1. Ursprüngliche Aufgabenstellung

Senckenberg fokussierte sich auf die Weiterentwicklung und Testung von sogenannten „Rapid Assessment Methods“, also verschiedenen molekularen Methoden für eine schnelle, effektive und kosten-effiziente Erfassung von benthischen Lebensgemeinschaften. Es sollten zwei verschiedene Methoden angewendet werden, zum einen das Metabarcoding, das auf der parallelen Sequenzierung von kurzen DNA-Fragmenten beruht. Die andere Methode MALDI-TOF MS (Matrix-assiierte Laser-Desorption-Ionisierung mit Flugzeitanalyse) untersucht mithilfe von Massenspektrometrie den proteomischen Fingerabdruck von Organismen. Mit beiden Methoden ist, im Vergleich zu einer morphologischen Untersuchung, eine schnellere Erfassung des Bestands an Tieren und der Biodiversität möglich.

Die Anwendung der Methoden sollte insbesondere im Zusammenhang mit dem möglichen, zukünftigen Tiefseebergbau in der Clarion Clipperton Bruchzone (CCZ) erprobt werden. Ziel war es, ein standardisiertes Vorgehen zu entwickeln, das für sowohl im Bereich des Monitoring verwendet werden kann, als auch um im Vorfeld zu Bergbau-Aktivitäten Management-Pläne zu entwickeln. Dazu sollten die neuen molekularen Methoden während des Tests des Manganknollen-Kollektor Pre-Prototypes PATANIA 2 der belgischen Firma DEME-GSR erprobt werden.

2. Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde

Die benthische Lebensgemeinschaft der CCZ wird bereits seit 2010 bei Senckenberg untersucht. Insbesondere im Lizenzgebiet für die Exploration von Manganknollen der BGR (Deutschland) konnten wir auf Referenz-Daten aus früheren Expeditionen zurückgreifen, insbesondere auf Ergebnisse aus der ersten Phase des Mining Impact-Projektes sowie Proben, die 2018 während der Expedition SO-262 mit dem Forschungsschiff SONNE genommen wurden.

Ursprüngliche Grundlage des Vorhabens war die Expedition SO-268 mit dem Forschungsschiff SONNE im Jahr 2019. Durch Verzögerungen des Kollektor-Tests, der parallel zu dieser Fahrt geplant worden war, wurde die Schiffszeit genutzt um zusätzliche Referenz-Daten im Testgebiet zu erheben. Außerdem wurde ein Störungsexperiment in einem kleineren Maßstab durchgeführt und beprobt.

Nach weiteren Verzögerungen wurde 2021 der Kollektor-Test in zwei Lizenzgebieten (BGR und GSR) durchgeführt. Zeitgleich wurde mit der Expedition IP-21 auf dem Motorschiff ISLAND PRIDE ein Monitoring der Störung durchgeführt.

3. Planung und Ablauf des Vorhabens

Durch den Ausfall des Kollektor-Tests, sowie weitere Verzögerungen u.a. durch die Pandemie, konnte die ursprüngliche Planung nicht eingehalten werden. Dennoch wurde die Expedition SO-268 erfolgreich durchgeführt und die molekularen Methoden konnten mit Referenz-Proben (Baseline) und den Proben des kleinen Störungsexperiments erprobt werden.

Auch die zusätzliche Expedition IP-21 wurde erfolgreich durchgeführt. Nach dem Ende des Kollektor-Tests konnten allerdings nur sehr wenige biologische Proben genommen werden. Aus diesem Grund ist eine Weiterbearbeitung der Thematik mit Proben der Expedition SO-295 geplant.

4. Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde

(...insbesondere Angabe bekannter Konstruktionen, Verfahren und Schutzrechte, die für die Durchführung des Vorhabens benutzt wurden und Angabe der verwendeten Fachliteratur sowie der benutzten Informations- und Dokumentationsdienste)

Die Verwendung von Metabarcoding zur Untersuchung extrazellulärer DNA wurde bereits erfolgreich an Tiefseesedimenten des Mittelmeeres getestet (Guardiola et al. 2015, 2016) Die morphologisch-taxonomische Bestimmung der Tiere ist meist zu zeitaufwendig, um Muster und Verschiebungen in den benthischen Gemeinschaften zu erkennen (Guardiola et al. 2015). Dennoch lassen sich bisher nicht alle Arten des taxon Nematoda mithilfe des Metabarcodings nachweisen bzw. unterscheiden (Dell'Anno et al. 2015).

MALDI-TOF MS ist im Gegensatz zum DNA-Barcoding eine sehr kostengünstige Methode um einzelne Tiere zu identifizieren (Rossel and Martínez Arbizu 2018a). Der sogenannte „proteomic fingerprint“ wurde im marinen Bereich insbesondere erfolgreich verwendet um Ruderfußkrebse (Copepoda) zu identifizieren (Laakmann et al. 2013; Bode et al. 2017; Rossel and Martínez Arbizu 2018a, b).

Um die Auswirkungen von Bergbau auf die Tiefsee und ihre Organismen zu untersuchen wurden verschiedene Projekte durchgeführt. 1975 wurde die “Deep Ocean Mining Environmental Study (DOMES; NOAA und DoC, 1976) im Ost-Pazifik durchgeführt. Von 1977 an wurde die Studie “Metalliferous Sediment Atlantis II Deep” (MESEDA; Karbe et al., 1981) im Roten Meer ausgeführt und bis 1981 abgeschlossen. Im Laufe der folgenden Jahre wurden weitere Experimente in der Tiefsee durchgeführt, so zum Beispiel das “Japan Deep-Sea Impact Experiment” (JET; Fukushima, 1995) und das “Indian Deep-Sea Environment Experiment” (INDEX; Ingole et al., 2001; Sharma, 2001).

Basierend auf den Erfahrungen und Ergebnissen dieser ersten Tiefsee-Umweltverträglichkeitsuntersuchungen, wie o. e. DOMES and MESEDA, wurde das Projekt “Disturbance and re-Colonization experiment in the South Pacific” (DISCOL; Foell et al., 1992; Thiel und Schriever, 1989; Schriever, 1995; Thiel, 1991) als erstes Langzeitexperiment ins Leben gerufen.

In dem vorherigen Projekt JPI-O MiningImpact (2015-2018) wurde die Untersuchung der DISCOL-area (DEA) fortgeführt, ebenso wie grundlegende Untersuchungen der Fauna des Manganknollengürtels der Clarion-Clipperton Fracture Zone. Dieses Folge-Projekt knüpft an diese Ergebnisse an.

5. Zusammenarbeit mit anderen Stellen

GEOMAR – Helmholtz-Zentrum für Ozeanforschung Kiel (Projekt-Koordination)

Sowie weitere Partner des JPIO-Mining Impact Konsortiums

Insbesondere:

Dr. Ana Hilario und Dr. Sofia Ramalho, Universidade Aveiro, Portugal (Megafauna)

Dr. Patricia Esquete, Universidade de Aveiro, Portugal (Makrofauna)

Dr. Lenaick Menot IFREMER, Brest, Frankreich (Makrofauna)

Dr. Freija Hauquier, Dr. Ellen Pape und Prof. Dr. Ann Vanreusel, Ghent University, Belgien (Meiofauna)

Dr. Sabine Gollner und Coral Diaz, Royal Netherlands Institute for Sea Research, Niederlande (Meiofauna und Restorationsexperimente)

Dr. Annemiek Vink (Expedition IP-21)

Franck Lejzerowicz, Université de Genève, Schweiz (eDNA)

Tristan Cordier, NORCE, Norwegen (eDNA)

6. Literatur

- Bode M, Laakmann S, Kaiser P, et al (2017) Unravelling diversity of deep-sea copepods using integrated morphological and molecular techniques. *J Plankton Res* 39:600–617. <https://doi.org/10.1093/plankt/fbx031>
- Dell'Anno A, Carugati L, Corinaldesi C, et al (2015) Unveiling the biodiversity of deep-sea nematodes through metabarcoding: Are we ready to bypass the classical taxonomy? *PLOS ONE* 10:e0144928. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0144928>
- Foell, E. J., G. Schriever, H. Bluhm, C. Borowski, C. Bussau and H. Thiel (1992). Disturbance and recolonization experiment in the abyssal South Pacific Ocean (DISCOL): an update. Proceedings of the 24th Annual Offshore Technology Conference, Houston Texas, May 4-7, 1992. OTC Paper 6805, 25-34.
- Fukushima, T., (1995) Overview: Japan deep-sea impact experiment = JET. Proceedings of the first. ISOPE Ocean Mining Symposium, Tsukuba, Japan, 47-53.
- Guardiola M, Uriz MJ, Taberlet P, et al (2015) Deep-sea, deep-sequencing: Metabarcoding extracellular DNA from sediments of marine canyons. *PLOS ONE* 10:e0139633. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0139633>
- Guardiola M, Wangenstein OS, Taberlet P, et al (2016) Spatio-temporal monitoring of deep-sea communities using metabarcoding of sediment DNA and RNA. *PeerJ* 4:. <https://doi.org/10.7717/peerj.2807>
- Ingole, B.S., Ansari, Z.A., Rathod, V., Rodrigues N., 2001: Response of deep-sea macrobenthos to a small-scale environmental disturbance. *Deep-Sea Research II* 48, 3401–3410.
- Karbe L., Thiel H., Weikert H., Mill A.J.B. (eds.) (1981) Mining of metalliferous sediments from the Atlantis II Deep, Red Sea: pre-mining environmental conditions and evaluation of the risk to the environment. EIS report to the Saudi-Sudanese Red Sea Joint Commission, Jeddah 352 pp.
- Laakmann S, Gerds G, Erler R, et al (2013) Comparison of molecular species identification for North Sea calanoid copepods (Crustacea) using proteome fingerprints and DNA sequences. *Mol Ecol Resour* 13:862–876. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12139>
- NOAA und DoC (1976) Deep Ocean Mining Environmental Study – Information And Issues. National Oceanic and Atmospheric Administration, Department of Commerce, 1-20.
- Bode M, Laakmann S, Kaiser P, et al (2017) Unravelling diversity of deep-sea copepods using integrated morphological and molecular techniques. *J Plankton Res* 39:600–617. <https://doi.org/10.1093/plankt/fbx031>
- Dell'Anno A, Carugati L, Corinaldesi C, et al (2015) Unveiling the biodiversity of deep-sea nematodes through metabarcoding: Are we ready to bypass the classical taxonomy? *PLOS ONE* 10:e0144928. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0144928>
- Guardiola M, Uriz MJ, Taberlet P, et al (2015) Deep-sea, deep-sequencing: Metabarcoding extracellular DNA from sediments of marine canyons. *PLOS ONE* 10:e0139633. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0139633>
- Guardiola M, Wangenstein OS, Taberlet P, et al (2016) Spatio-temporal monitoring of deep-sea communities using metabarcoding of sediment DNA and RNA. *PeerJ* 4:. <https://doi.org/10.7717/peerj.2807>
- Laakmann S, Gerds G, Erler R, et al (2013) Comparison of molecular species identification for North Sea calanoid copepods (Crustacea) using proteome fingerprints and DNA sequences. *Mol Ecol Resour* 13:862–876. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12139>
- Rossel S, Martínez Arbizu P (2018a) Automatic specimen identification of Harpacticoids (Crustacea:Copepoda) using Random Forest and MALDI-TOF mass spectra, including a post hoc test for false positive discovery. *Methods Ecol Evol* 9:1421–1434. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.13000>
- Rossel S, Martínez Arbizu P (2018b) Effects of sample fixation on specimen identification in biodiversity assemblies based on proteomic data (MALDI-TOF). *Front Mar Sci* 5:149. <https://doi.org/10.3389/fmars.2018.00149>

- Schriever, G. (1995) DISCOL - Disturbance and recolonization experiment of a manganese nodule area of the southeastern Pacific. Proceedings of the First (1995) ISOPE - Ocean Mining Symposium, Tsukuba, Japan, Nov. 21-22, 1995. 163-166.
- Sharma, R., (2001) Indian Deep-sea Environment Experiment (INDEX): An appraisal. Deep-Sea Research II 48, 3295–3307.
- Thiel, H. (1991) The requirement for additional research in the assessment of environmental disturbances associated with deep seabed mining In: J. N. T. Mauchline (eds.): Marine Biology, its Accomplishment and Future Prospect. , Hokusen-Sha: 133-144.
- Thiel, H. and G. Schriever (1989) Cruise-Report DISCOL 1, SONNE - Cruise 61, with contributions by C. Borowski, C. Bussau, D. Hansen, J. Melles, J. Post, K. Steinkamp and K. Watson. Ber. Zentrum Meeres- u. Klimaforsch. Univ. Hamburg 3: 91 pp.

II. Eingehende Darstellung

1. der im Rahmen des Vorhabens durchgeführten Arbeiten,

(...insbesondere im Vergleich zur ursprünglichen Vorhabenbeschreibung)

a) Aufbau einer Referenzbibliothek von DNA-Barcodes

Der größte Teil (> 90%) der in der Tiefsee vorkommenden Arten ist nicht wissenschaftlich beschrieben (Ramirez-Llodra et al. 2010) und für die meisten Arten liegt auch kein DNA-Barcode vor, der zur Identifizierung verwendet werden könnte. Dies ist insbesondere bei der Anwendung des Metabarcodings ein großer Nachteil, denn bei dieser Methode gibt es außer den molekularen Ergebnissen kein Tier, das zusätzlich morphologisch betrachtet werden könnte. Aus diesem Grund wurde neben der Anwendung der molekularen Untersuchungsmethoden auch der Ausbau der Referenzbibliothek der in der Clarion Clipperton Fracture Zone vorkommenden Arten vorangetrieben. Dabei lag der Fokus auf den beiden DNA-Barcoding-Regionen CO1 (mitochondrial) und V1V2 (nuklear). Die gewonnenen DNA-Barcodes werden in der Datenbank BOLD (<https://www.boldsystems.org/>) in Kombination mit Informationen zur Taxonomie und dem Belegexemplar hinterlegt.

Während der Expedition SO268 konnten 158 größere Tiere mit Kastengreifer und ROV (Remotely Operated Vehicle; Tauchroboter) gesammelt und mit unterschiedlicher Genauigkeit bestimmt werden. Die meisten Tiere gehören zu den Echinodermata, von denen Ophiuroidea die größte Gruppe darstellen (86 Tiere), dazu kommen Echinoidea (24 Tiere), Holothuroidea (18 Tiere) und Asteroidea (11 Tiere). Zusätzlich wurden elf Porifera, sechs Decapoda und eine Anthozoa gesammelt. Von diesen konnten bisher 112 Tiere morphologisch-genetisch 21 potentiellen Arten zugeordnet werden. Ein Beispiel ist ein Einsiedlerkrebs, der mit dem ROV gesammelt und der Art *Parapagurus* cf. *microps* zugeordnet werden könnte (Abbildung II.1).

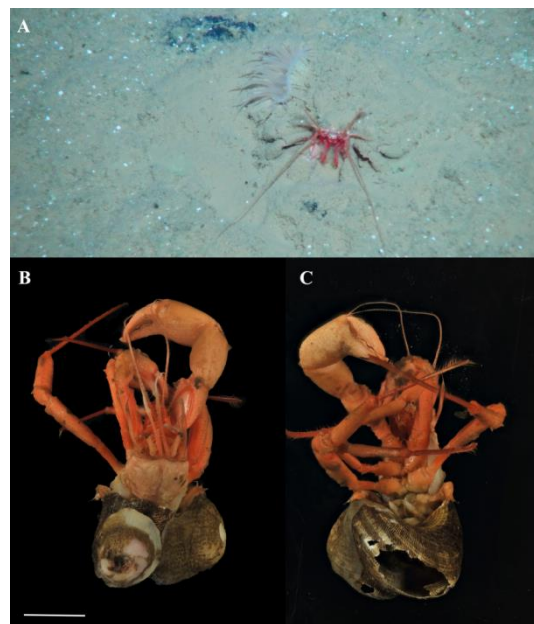


Abbildung II.1: Mit dem ROV gesammeltes Exemplar von *Parapagurus* cf. *microps* in situ (A) sowie nach der Probenahme dorsal (B) und ventral (C).

Basierend auf einem Dataset aus früheren Fahrten konnte außerdem die Referenzbibliothek der Ophiuroidea verbessert werden (Christodoulou et al. 2019, 2020). Insgesamt konnten 43 potentielle Arten von Ophiuroidea unterschieden werden, von denen es sich bei 13 um Singletons handelt, die nur einmal im Datensatz vorhanden waren (Christodoulou et al. 2020). 14 dieser potentiellen Arten

wurden außerdem im südöstlich der CCZ gelegenen DISCOL-Gebiet gefunden (Christodoulou et al. 2020).

Außerdem konnten 535 Isopoda aus der CCZ sowie 84 weitere Individuen aus dem DISCOL-Gebiet zur Referenzdatenbank hinzugefügt werden (Brix et al. 2020). Diese Isopoden konnten in 187 Arten eingeteilt werden, von denen 91,4% noch nicht wissenschaftlich beschrieben sind (Brix et al. 2020). Allerdings deutet die hohe Anzahl an Arten, die nur ein einziges Mal gefunden wurden (40,5 %), sowie die Rarefaction-Analysen darauf hin, dass noch eine große Anzahl weiterer Arten in der CCZ erwartet werden muss (Brix et al. 2020).

Eine andere Gruppe an Krebstieren, die mit DNA-Barcoding untersucht wurden sind 10 Arten Aasfressender Amphipoda (Mohrbeck et al. 2021). Die Verwendung von DNA-Barcoding lässt vermuten, dass es bei zwei dieser Arten zu kryptischer Diversität kommt und es sich bei *Paralicella caperesca* Shulenberger & Barnard, 1976 um einen Artkomplex aus vier Arten handelt, während *Valettietta cf. anacantha* (Birstein & Vinogradov, 1963) zwei potentielle Arten beinhaltet (Mohrbeck et al. 2021).

Bei der Meiofauna lag der Fokus der Generierung von DNA-Barcodes auf dem Taxon Coepoda. Rossel et al. (eingereicht) konnten DNA-Barcodes von 1296 Tieren gewonnen werden, die sich mit unterschiedlichen Algorithmen in 718 bis 794 Arten unterteilen ließen. Die variable Einteilung ist vermutlich auf die große Anzahl von Arten im Datensatz, die nur ein einziges Mal gefunden wurden, zurück zu führen. In dieser Studie wurden die Artunterteilungen nicht morphologisch bestätigt, sondern mit der Unterteilung aufgrund des Proteomischen Fingerabdrucks verglichen.

Insgesamt enthält unsere Datenbank zurzeit **8058** Sequenzen von 7897 Tiefseeorganismen die **2029** Arten (BINs) darstellen und ist somit die weltweit größte genetische Referenzbibliothek von Tiefseeorganismen.

b) Meiofauna untersucht mit MALDI-TOF MS

Für die Anwendbarkeitsuntersuchung des proteomischen Fingerabdrucks von Meiofaunaorganismen mit MALDI-TOF MS (matrix-assisted laser desorption/ionisation time of flight mass spectrometry) wurden 2115 meiobenthische Copepoda untersucht. Zugleich wurde mit DNA-Barcoding eines Teils des CO1-Gens ein genetische Fingerabdruck ermittelt, um die mit MALDI-TOF MS gewonnenen Ergebnisse mit einer weiteren molekularen Methode vergleichen zu können. Zu Beginn der Untersuchungen wurden, nach Rossel & Martínez Arbizu (2019), die Copepoda in zwei Hälften zerteilt, von denen jeweils die vordere Hälfte für die Untersuchung mit MALDI-TOF MS verwendet wurde, die hintere für das DNA-barcoding.

Nachdem 58% der Tiere bearbeitet waren, konnten wir das Protokoll von Rossel & Martínez Arbizu (2019) verbessern, indem wir das gesamte Tier zuerst für die Bearbeitung mit MALDI-TOF MS für 5 min in 4 µl HCCA-Matrix inkubierten, es danach in 10 µl molekularem Wasser wuschen und danach die DNA-Extraktion durchgeführt haben. Auf diese Weise konnten wir die Erfolgsrate ein Massenspektrum zu erhalten erhöhen, da in diesem Schritt mehr Biomasse zur Verfügung stand. Zugleich blieb die Ausbeute an DNA-Barcodes gleich.

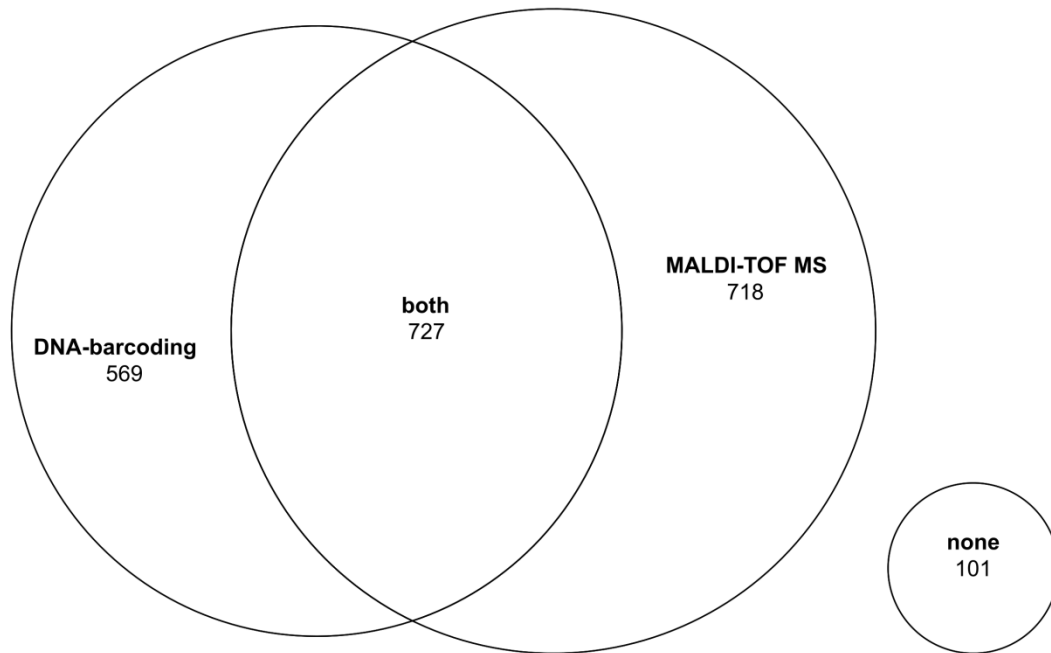


Abbildung II.2: Euler-Diagramm der Erfolgsrate der beiden molekularen Methoden DNA-Barcoding und MALDI-TOF MS bei der Untersuchung von meiobenthischen Copepoda.

Die Erfolgsrate von beiden molekularen Methoden war ähnlich mit 1445 Tiere (68,3%) mit MALDI-Spektrum sowie 1296 Tieren (61,3%) für die ein DNA-Barcode gewonnen werden konnte (Abbildung II.2). Lediglich für 101 Tiere (4,7%) konnte weder ein DNA-Barcode noch ein verwendbares MALDI-Spektrum erstellt werden (Abbildung II.2).

Um die gewonnenen DNA-Barcodes und MALDI-Spektren in potentielle Arten (taxonomische Einheiten, OTU) einzuteilen wurden insgesamt vier verschiedene, bereits zuvor publizierte, Algorithmen verwendet, jeweils zwei, die genetische Daten verwenden und zwei, die mit proteomischen Daten arbeiten. Insgesamt war die Variabilität der Anzahl der Arten relativ gering. Betrachtet man den Datensatz, der alle Tiere für die es sowohl proteomische als auch genetische Daten gibt enthält, schwankt die berechnete Shannon Diversität zwischen 5.6 und 6.1 (Tabelle II.1), wobei basierend auf den MALDI-Spektren eine etwas größere Shannon Diversität berechnet wird. Auch Pielous Evenness ist bei den proteomischen Daten geringfügig höher, sie beträgt für den kleineren Datensatz, für den es sowohl MALDI- als auch DNA-Barcoding-Daten gibt, 0.97-0.98 und für den Datensatz aus allen Tieren mit MALDI-Spektren 0.97 (Tabelle II.1). Basierend auf den DNA-Daten liegt die Evenness bei 0.96-0.97 (Tabelle II.1).

Betrachtet man die Anzahl der potentiellen Arten, werden mit der Methode von Renz et al (2021), die auf proteomischen Daten basiert, die meisten taxonomischen Einheiten berechnet (Tabelle II.1). Die zweite Methode von Rossel & Martínez Arbizu (2020), die ebenfalls auf proteomischen Daten basiert, berechnet mit 499 taxonomischen Einheiten beinahe 30 Arten weniger (Tabelle II.1). Basierend auf den genetischen Daten werden zwischen 440 und 489 taxonomische Einheiten berechnet (Tabelle II.1). Obwohl basierend auf den genetischen Daten tendenziell weniger taxonomische Einheiten berechnet werden, ist die Variabilität der Ergebnisse zwischen den Algorithmen, die auf verschiedenen Datensätzen (proteomisch oder genetisch) beruhen ebenso groß wie zwischen Methoden, die dieselben Daten verwenden. Da nur sehr wenige in der CCZ vorkommende Arten wissenschaftlich beschrieben sind, können wir unsere Ergebnisse nicht validieren und keine Aussage darüber treffen, welche der Methoden die tatsächliche Artenzusammensetzung am besten widerspiegelt. Wir können allerdings sagen, dass die Ergebnisse mit MALDI-TOF MS mit den Ergebnissen des etablierteren DNA-Barcodings vergleichbar sind und sich die Methode als eine potentielle, kostengünstige Alternative zur Artidentifizierung erwiesen hat. Für eine breite Anwendung für das Monitoring von Störungen wäre es allerdings nützlich eine

Referenzbibliothek aufzubauen, um die untersuchten Tiere mithilfe des proteomischen Fingerabdrucks verifizierten Arten zuordnen zu können.

Tabelle II.1: Vergleich der Ergebnisse der genetischen Artabgrenzungsalgorithmen ABGD und GMYC mit den proteomischen Artabgrenzungsalgorithmen mit den Clustermethoden PAM und consensus clustering; zusätzlich zur Anzahl der berechneten taxonomischen Einheiten (Artäquivalente) wurden die Diversitätsindizes Shannon Diversität und Pielous Evenness berechnet (geändert nach Rossel et al. eingereicht).

	ABGD delimitation	GMYC delimitation	PAM delimitation	HC_CC delimitation
Quellenangabe	Puillandre et al. 2012	Pons et al. 2006	Rossel & Martínez Arbizu 2020	Renz et al. 2021
Methode	DNA-Barcoding	DNA-Barcoding	MALDI-TOF MS	MALDI-TOF MS
Datensatz mit n = 727 Tieren. DNA-Barcode und Massenspektrum für alle Tiere verfügbar.				
Anzahl der taxonomischen Einheiten	440	489	499	527
Shannon Diversität (H')	5.84	5.60	6.06	6.09
Pielous Evenness (J)	0.96	0.97	0.98	0.97
Datensatz mit n = 1.445 Tieren. Massenspektrum für alle Tiere verfügbar.				
Anzahl der taxonomischen Einheiten	n.v.	n.v.	815	1,023
Shannon Diversität (H')	n.v.	n.v.	6.48	6.70
Pielous Evenness (J)	n.v.	n.v.	0.97	0.97
Datensatz mit n = 1.296 Tieren. DNA-Barcode für alle Tiere verfügbar.				
Anzahl der taxonomischen Einheiten	718	794	n.v.	n.v.
Shannon Diversität (H')	6.30	6.44	n.v.	n.v.
Pielous Evenness (J)	0.96	0.96	n.v.	n.v.

c) Ergebnisse zum Dredge Experiment

Das Dredge-Experiment wurde im östlichen Explorationsgebiet der BGR für Manganknollen durchgeführt, etwa 5 km nordöstlich des Referenzgebietes und etwa 7,4 km südlich des Versuchsgebietes für den Test des Knollenkollektors Patania II (Haeckel et al. 2021). Bei diesem Ersatzexperiment für den Ausfall des Kollektortests wurden mit einer Kettendredge (Breite: 1,2 m) elf etwa 500 m lange Spuren gezogen, um eine Sedimentwolke aufzuwirbeln und deren Ausbreitung und ihren Einfluss auf die benthische Umwelt zu untersuchen (Haeckel et al. 2021).

Im Rahmen des Vorhabens RaBiMo wurden die Auswirkungen dieses Experiments auf die benthische Meiofauna mit den beiden Methoden Metabarcoding und MALDI-TOF MS untersucht. Die Proben wurden an 11 Stationen mit dem Multicorer genommen, davon waren zwei Stationen Kontrollproben (*control*), die nicht von der Störung beeinflusst wurden. Von den restlichen Proben befanden sich jeweils drei Stationen direkt in der Spur der Dredge (*dredge track*), drei weitere in einem Gebiet mit dichter Sedimentbedeckung (*thick cover*) sowie drei in einem Gebiet mit dünner Sedimentbedeckung (*thin cover*). Für die Methode MALDI-TOF MS wurde jeweils ein Rohr aus dem Multicorer untersucht, die Anzahl der Rohre, die für das Metabarcoding verwendet wurden schwankt zwischen eins und drei (Tabelle II.2) und beträgt insgesamt 20.

Als Barcode für das Metabarcoding wurden die hyper-variablen Regionen des 18S rRNA-Gens (V1V2) als DNA-Barcode verwendet. Die Untersuchung mit dem MALDI-TOF MS fokussiert sich auf das Taxon Coepoda, obwohl während des Aussortierens dieser Individuen auch die Abundanzen der restlichen Meiofauna erfasst wurden.

Tabelle II.2: Die für das Metabarcoding und MALDI-TOF MS bearbeiteten Störungsgrade, Stationen und Replikate.

	Stationen	n Corer für Metabarcoding	n Corer für MALDI-TOF MS
Control area	106	2	1
Control area	107	2	1
Dredge track	122	1	1
Dredge track	125	2	1
Dredge track	207	1	1
Faint cover	198	2	1
Faint cover	199	2	1
Faint cover	200	3	1
Thick cover	184	2	1
Thick cover	185	2	1
Thick cover	186	1	1
total	11	20	11

Insgesamt wurden mit dem Metabarcoding 2.874.164 reads erzeugt, die in 2588 ASVs (vervielfältigte Sequenzvariante, eng. amplicon sequence variant) eingeteilt werden konnten. Mit dem Algorithmus GMYC (Generalized Mixed Yule Coalecent, Pons et al. 2006) wurden diese ASVs in 606 potentielle Arten (GOTUs, engl. genetic operational taxonomic units) unterteilt. Diese lassen sich, mit abnehmender relativer Häufigkeit, den Taxa Nematoda, Crustacea, Platyhelminthes, Bryozoa, Gastrotricha, Nemertea, Hemichordata, Loricifera, Entoprocta, Scaphopoda, Sipuncula und Tardigrada zuordnen. Nematoda ist das häufigste Meiofauna-Taxon mit 267 GOTUs, gefolgt von Annelida (140 GOTUs) und Crustacea (107 GOTUs). Eine Untersuchung der Crustacea auf dem taxonomischen Niveau der Ordnung zeigte fünf Ordnungen der Copepoda (Harpacticoida, Cyclopoida, Calanoida, Misophrioida und Siphonostomatoida), sowie vier Arten der Ostracoda. Harpacticoiden Copepoden sind im Vergleich mit anderen Crustacea mit 57 GOTUs am häufigsten vertreten, gefolgt von den Cyclopoida mit 24 GOTUs und den Calanoida mit 14 GOTUs.

Für die Bearbeitung mit MALDI-TOF MS wurden insgesamt 472 benthische Copepoda aussortiert und für 81% dieser Tiere konnte ein Massenspektrum erhoben werden. Diese konnten unter der Verwendung des Clusteralgorithmus PAM in 336 potentielle Arten (POTUs, engl. proteomic operational taxonomic units) eingeteilt werden. In dieser Aufteilung waren vier POTUs, bei denen ein

Vergleich der Referenzfotographien der Tiere oder das parallel durchgeführte DNA-Barcoding des CO1-Gens vermuten lassen, dass es sich bei diesen POTUs nicht um eine Art handelt. Zusätzlich wurden Individuen von vier Arten, die mit DNA-Barcoding nachgewiesen werden konnten, nicht alle in entsprechende Artencluster auf Basis von Massenspektren zusammengeführt. Dies konnte auf unterschiedliche Entwicklungsstadien der Individuen zurückgeführt werden. Während ein COI-Barcode innerhalb einer Art sehr stabil ist, kommt es bei einigen Arten vor, dass sich Massenspektren verschiedener Entwicklungsstadien so unterscheiden, dass sie mit der angewandten Methode nicht als eine Art erkannt werden.

Ein Vergleich der mit dem Metabarcoding identifizierten Meiofauna-Gemeinschaft der verschiedenen Störungsgrade mit PERMANOVA, ergab signifikante Unterschiede sowohl bei einer Betrachtung der gesamten Meiofauna Gemeinschaft (Abbildung II.3a) als auch der Crustacea (Abbildung II.3b) ($p < 0.001$). Wurde die mit MALDI-TOF MS untersuchten Gemeinschaft der Copepoda zwischen den Störungsgraden verglichen (Abbildung II.4) ließen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Störungsgraden feststellen. Eine mögliche Erklärung ist die im Vergleich zum Metabarcoding kleinere Datenmenge, da nur halb so viele Corer verwendet wurden und nur eine Großgruppe betrachtet wurde.

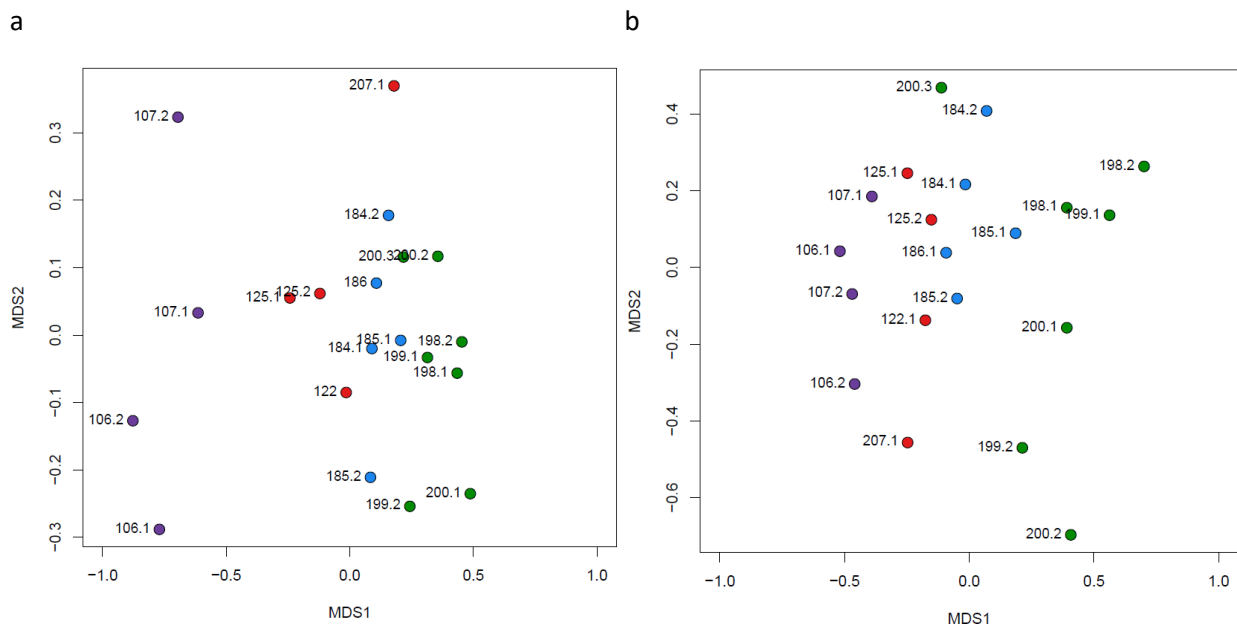


Abbildung II.3: Nicht metrische Multidimensionale Skalierung der Zusammensetzung der mit Metabarcoding identifizierten Meiofauna (a) und der Crustacea (b) unter den verschiedenen Störungsgraden (violett: *control*, rot *dredge track*, grün *faint cover*, blau *thick cover*) basierend auf euklidischen Distanzen. Die Daten wurden logarithmisch sowie nach Hellinger transformiert.

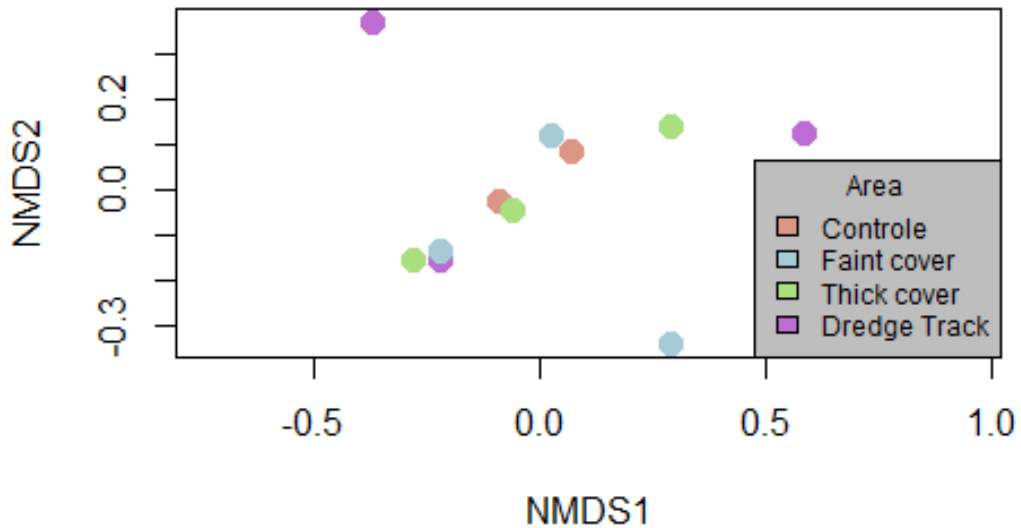


Abbildung II.4: Nicht metrische Multidimensionale Skalierung der Zusammensetzung der der mit MALDI-TOF MS identifizierten Copepoda unter den verschiedenen Störungsgraden (rot: *control*, violett: *dredge track*, blau *faint cover*, grün *thick cover*) basierend auf Bray-Curtis Unähnlichkeit.

Vergleicht man die Anzahl der potentiellen Arten, die mit dem Metabarcoding, die nur in einem Störungsgrad vorkamen, war diese Anzahl im ungestörten Gebiet (*control*) mit 147 GOTUs am höchsten und bei einer geringen Sedimentbedeckung (*faint cover*) am niedrigsten (Abbildung II.5). 81 GOTUs wurden in allen Störungsgraden detektiert (Abbildung II.5). Betrachtet man die Verteilung der potentiellen Arten, die mit MALDI-TOF MS bestimmt wurden, kamen lediglich 2 POTUs in allen Störungsgraden vor (Abbildung II.6). Die Anzahl der POTUs, die in nur einem Störungsgrad vorkommen, ist ebenfalls am geringsten im Gebiet mit geringer Sedimentbedeckung (*faint cover*) mit 61 POTUs und am höchsten im Gebiet mit hoher Sedimentbedeckung (*thick cover*) mit 94 POTUs (Abbildung II.6). Die geringe Anzahl an POTUs, die in allen Gebieten vorkommen, lässt sich vermutlich auf die sehr hohe Anzahl an Singletons bzw. POTUs, die seltener als viermal im ganzen Datensatz vorkommen, zurückführen.

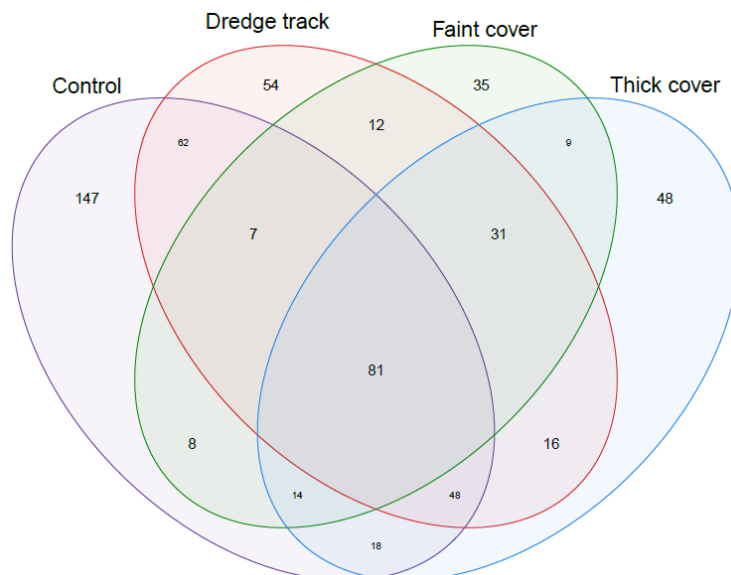


Abbildung II.5: Venn diagramm des Vorkommens der mit Metabarcoding identifizierten Meiofauna GOTUs in den verschiedenen Störungsgraden.

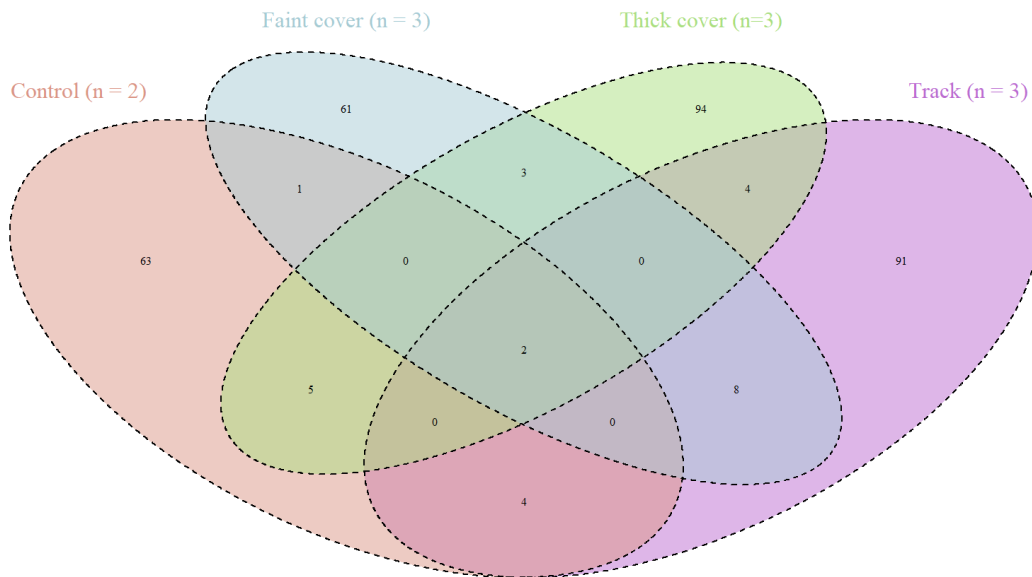


Abbildung II.6: Venn diagramm des Vorkommens der mit MALDI-TOF MS identifizierten Copepoda POTUs in den verschiedenen Störungsgraden.

d) Untersuchung der Meiofauna im Gebiet des Kollektor-Tests mit Metabarcoding

Metabarcoding-Proben der Meiofauna wurden von sieben MUC-Stationen (2-4 Corer pro Einsatz) gesammelt und analysiert, davon 3 Stationen im BGR Gebiet vor dem Kollektortest, 2 Stationen im Referenzgebiet für den Test im BGR-Gebiet (IRZ) und 3 Stationen nach dem Test in den Spuren des Kollektors. Insgesamt wurden 720.972 Sequenzierungs-Reads (V1V2-Genfragment) aus einem MiSeq-Lauf generiert, die nach Anwendung von Filtern, De-Noising, Merging und Chimären-Erkennung mit der DADA2-Pipeline 548.317 Reads ergaben. Insgesamt ergaben sich 3300 ASVs, von denen 1144 als Meiofauna-Ziel-ASVs extrahiert wurden. Rarefaction-Analysen (Abbildung II.7) zeigen eine ausreichende Sequenzierungstiefe für die Mehrzahl der untersuchten Stationen und Replikate, wenn man sie mit der Anzahl der gefundenen ASVs vergleicht. Abbildung II.8 zeigt die entdeckten Meiofauna-Gemeinschaften, kategorisiert nach Klassen und Ordnungen, für jede Station/jeden Kern von MUC. Die taxonomischen Zuordnungen wurden zunächst von NCBI abgerufen und durch WoRMS (World Register of Marine Species) bestätigt.

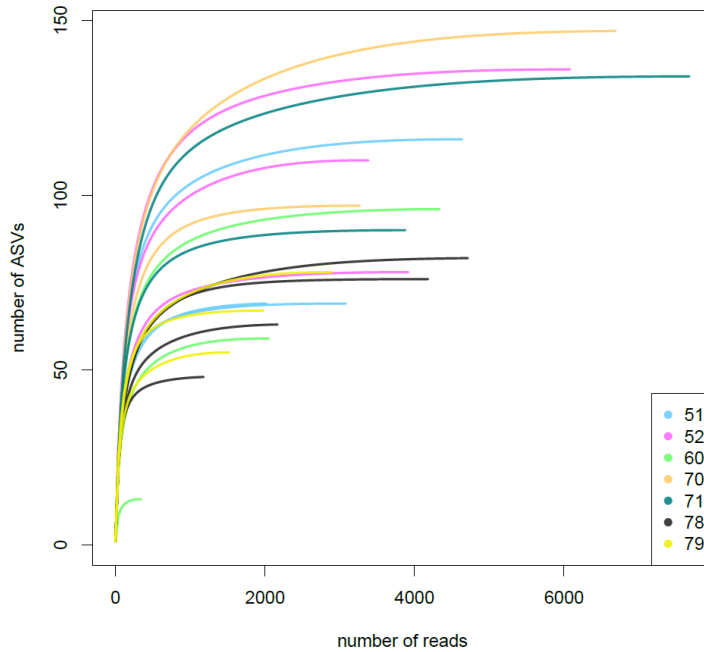


Abbildung II.7: Rarefaction-Kurven, die die Anzahl der erkannten ASVs im Vergleich zur Anzahl der Reads für jede der sieben untersuchten Stationen mit 2 bis 4 Cores zeigen.

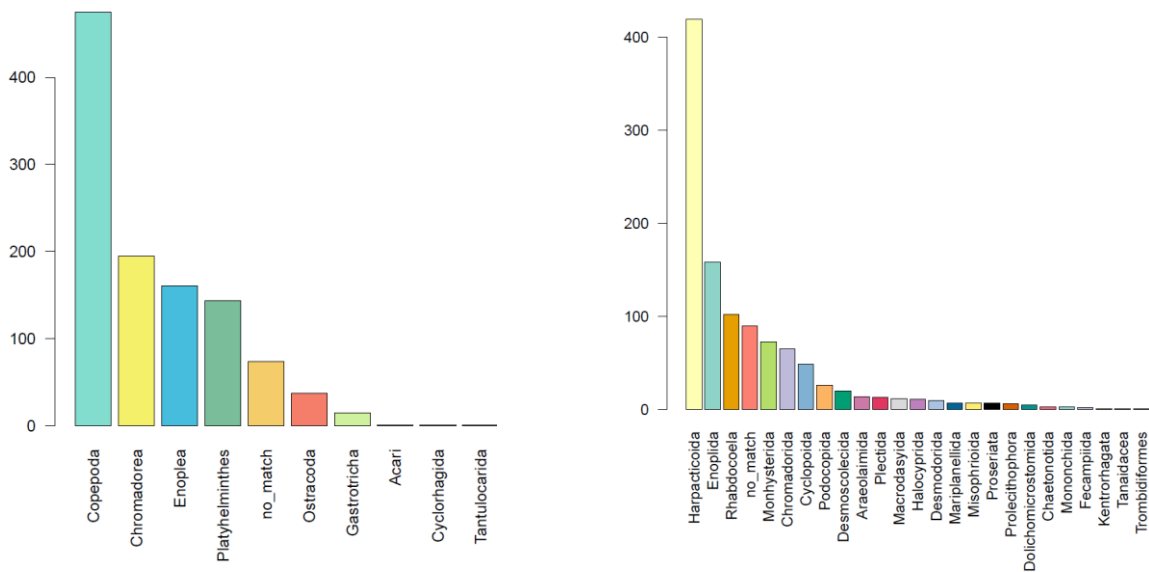


Abbildung II.8: Balkendiagramme der Meiofauna-Gemeinschaften auf Klassenebene (links) und Ordnungsebene (rechts), die aus MUC-Proben durch Metabarcoding unter Verwendung von V1V2-Amplicons ermittelt wurden. Die Y-Achse zeigt die Anzahl der ASVs (vervielfältigte Sequenzvariante, eng. amplicon sequence variant).

Copepoda - hauptsächlich Harpacticoiden, wenige Cyclopoide und Misophrioiden - sind die vielfältigste Gruppe, gefolgt von Nematoda (insbesondere die Klassen Chromadorea und Enoplea). Platyhelminthes, gefolgt von Ostracoda, Gastrotricha, Acari, Kinorhyncha und Tantulocarida sind die übrigen Gruppen, von denen die meisten durch eine geringe Anzahl von ASVs nachgewiesen wurden. Die Diversität der Meiofauna ASVs (vervielfältigte Sequenzvariante, eng. amplicon sequence variant) entlang der Stationen und Gebiete zeigte eine ähnliche Zusammensetzung der Gemeinschaft sowohl vor als auch nach der Störung im BGR-Gebiet (Abbildung II.9). Eine leichte Abnahme der Anzahl von Copepoda (Harpacticoida) wurde im Referenzgebiet IRZ festgestellt. Ein ähnliches Muster ist in der Gemeinschaft der Harpacticoiden in den untersuchten Gebieten vor und nach der Störung zu beobachten, wobei Ectinosomatidae und Aegisthidae die vielfältigsten Familien sind. Seltene Taxa wie Zosimeidae und Normanellidae sind sowohl in den Gebieten vor und nach den Auswirkungen des Kollektortestes als auch in den Stationen bzw. Cores aus der IRZ zu finden (Abbildung II.9).

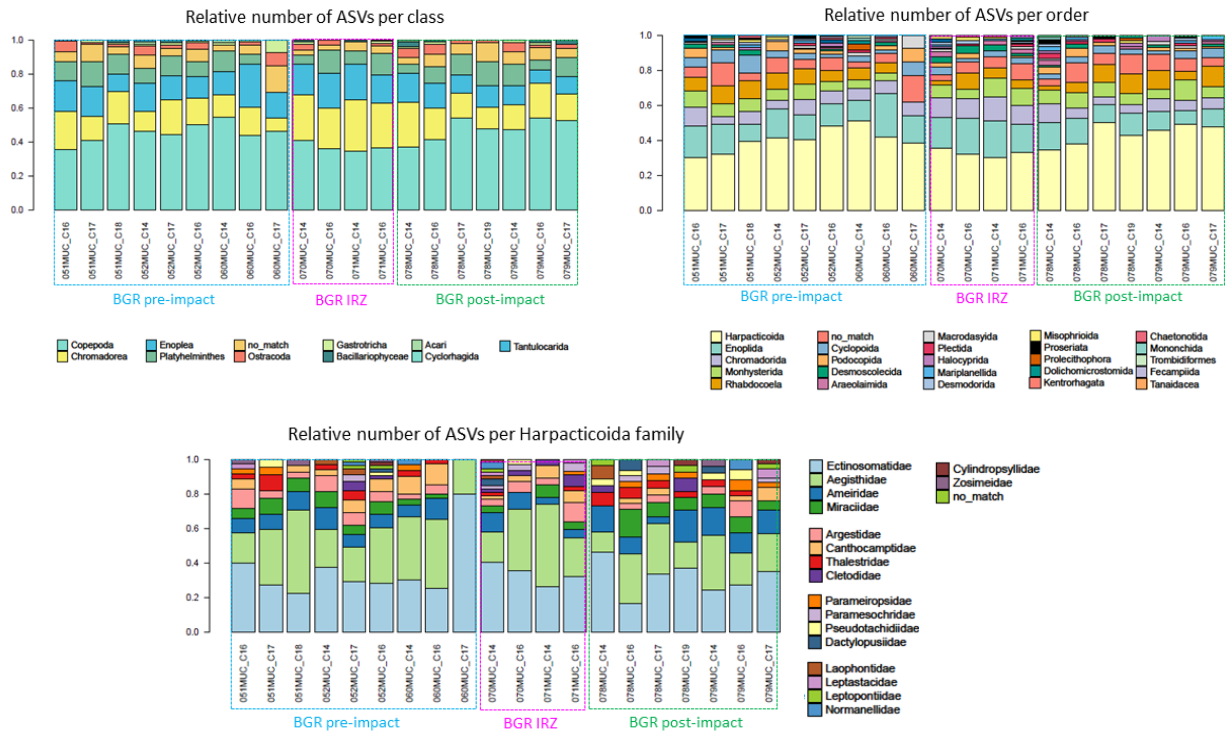


Abbildung II.9: Die relative Anzahl der ASV der Meiofauna auf Klassenebene (oben links) und Ordnungsebene (oben rechts) zeigt homogene Gemeinschaften in den untersuchten Gebieten vor und nach dem Kollektortest. Die relative Anzahl der Harpacticoida-Familien (unten links) wird im BGR-Gebiet vor und nach dem Kollektortest verglichen und zeigt das Vorkommen seltener Taxa in den betroffenen Gebieten.

Der Vergleich der nachgewiesenen Meiofauna-ASVs zwischen den Gebieten vor und nach dem Test (Abbildung II.10a) ergab nur 53 gemeinsame ASVs zwischen den drei Gebieten mit etwa 200 einzigartigen ASVs aus jedem der Gebiete nach der Störung sowie in der IRZ; das Testgebiet vor dem Test hatte jedoch die höchste Anzahl einzigartiger Meiofauna-Taxa im Vergleich zu den beiden anderen (403 ASVs). Die Analyse der Ähnlichkeiten mit Hilfe des PERMANOVA-Tests ergab signifikante Unterschiede zwischen den drei untersuchten Gebieten (Hellinger, logarithmische Transformation, $p=0,006$); allerdings wurden bei paarweisen Vergleichen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gebieten nach und vor der Störung festgestellt, während sich die IRZ in Bezug auf die Meiofauna-Gemeinschaften sowohl von den Gebieten vor als auch nach der Störung signifikant unterscheidet. Die Bray-Curtis-Unähnlichkeiten zwischen den Gebieten und Stationen sind im nMDS-Plot dargestellt (Abbildung II.10b). Die Analyse der ASVs zwischen den Stationen ergab eine hohe Anzahl einzigartiger ASVs, die zu jeder untersuchten Station gehören, unabhängig von dem Kollektortest. Die höchste Anzahl exklusiver ASVs gehört zu der Station 52 aus den Testgebiet vor der Störung ($n=166$), gefolgt von 159 einzigartigen ASVs von der Station 78 aus nach dem Kollektortest im gestörten Gebiet. Es gibt nur 6 ASVs, die allen Stationen gemeinsam sind, und nur wenige ASVs wurden an Stationen sowohl vor als auch nach dem Test gefunden (Abbildung II.11).

a

b

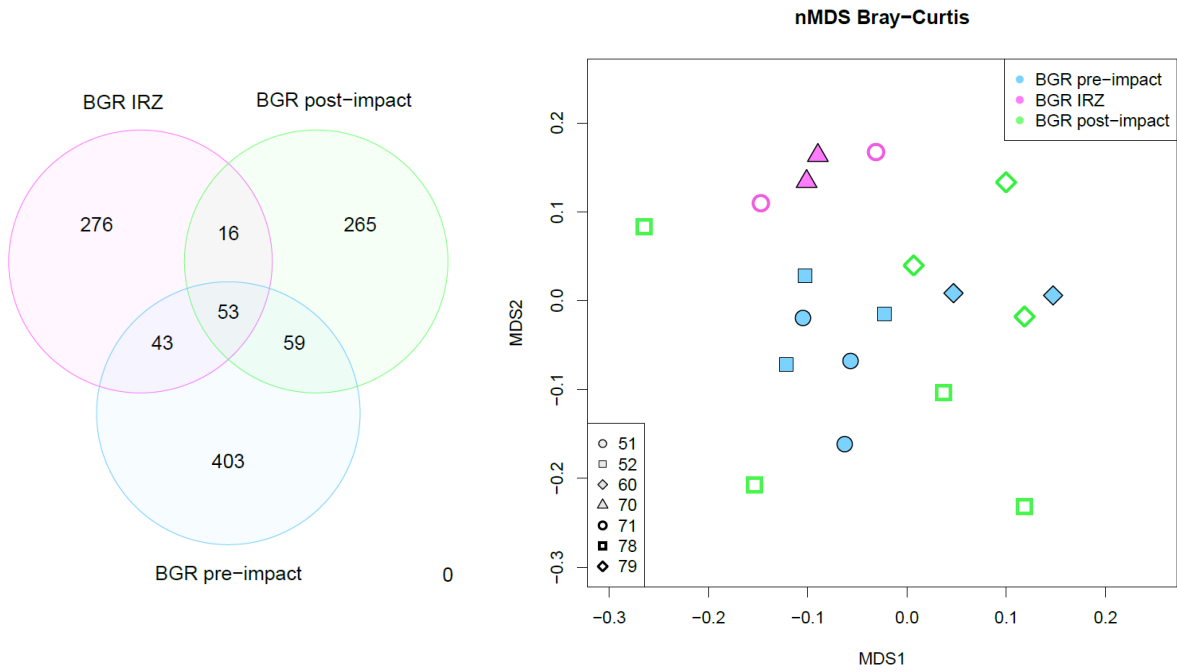


Abbildung II.10: Venn-Diagramm der Anzahl der ASVs im Testgebiet vor dem Kollektortest (BGR pre-impact), nach dem Test (BGR post-impact) sowie im Referenzgebiet (BGR IRZ) (a); Nicht-metrische multidimensionale Skalierung (nMDS) des Bray-Curtis-Indexes basierend auf denselben Unterteilungen, wobei sich das Referenzgebiet (IRZ) in seiner Meiofauna-Zusammensetzung signifikant von dem Testgebiet unterscheidet.

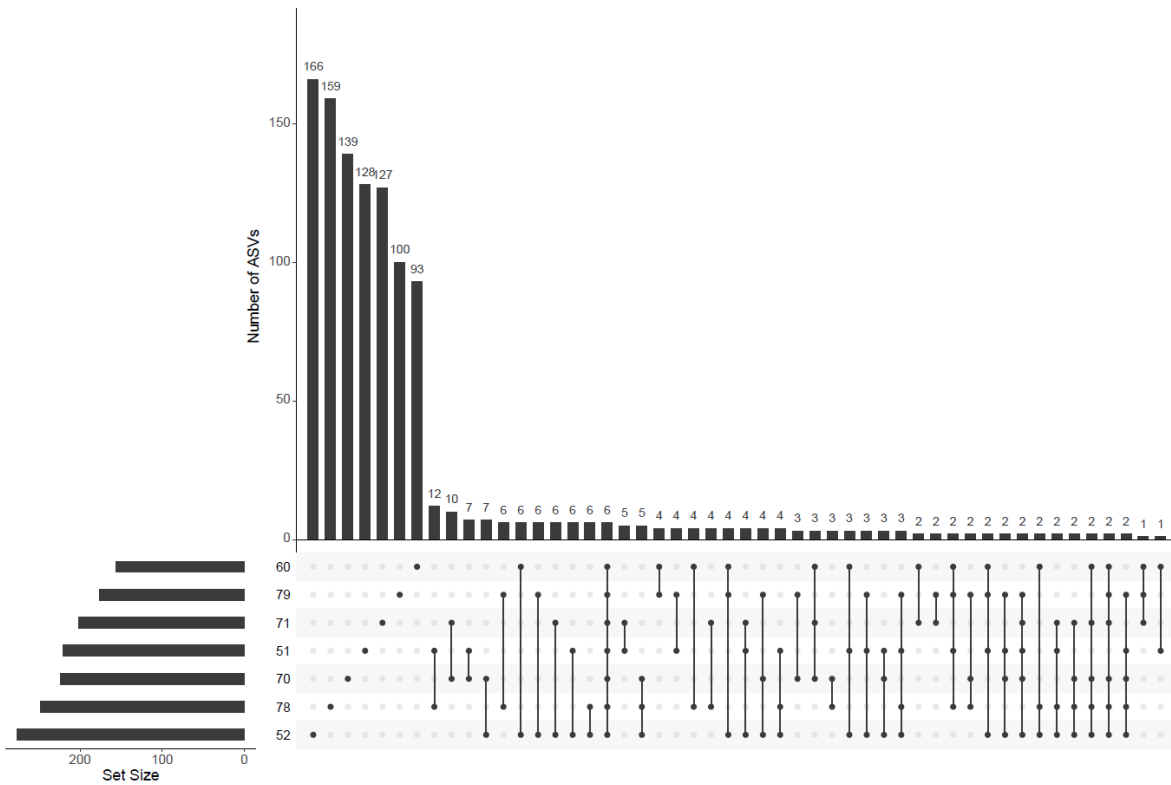


Abbildung II.11: UpSet-Plot zum Vergleich der Anzahl gemeinsamer und einzigartiger Meiofauna-ASVs zwischen den Stationen. Alle Stationen in den Gebieten nach und vor der Störung wiesen eine hohe Anzahl einzigartiger Meiofauna-Taxa auf, und nur 6 ASVs wurden an allen Stationen gefunden.

Der Diversitätsindex Evenness ist relativ hoch (0,85) und sehr ähnlich zwischen den Gebieten und Stationen, mit Ausnahme der Station 60 aus dem Testgebiet vor der Störung, die eine geringere Evenness aufweist (Abbildung II.12). Die erwartete Anzahl von ASVs zeigte jedoch einen

dramatischen Rückgang in nach der Störung im Vergleich zu Testgebiet vor dem Kollektortest und der IRZ (mit Ausnahme von Station 60) (Abbildung II.12).

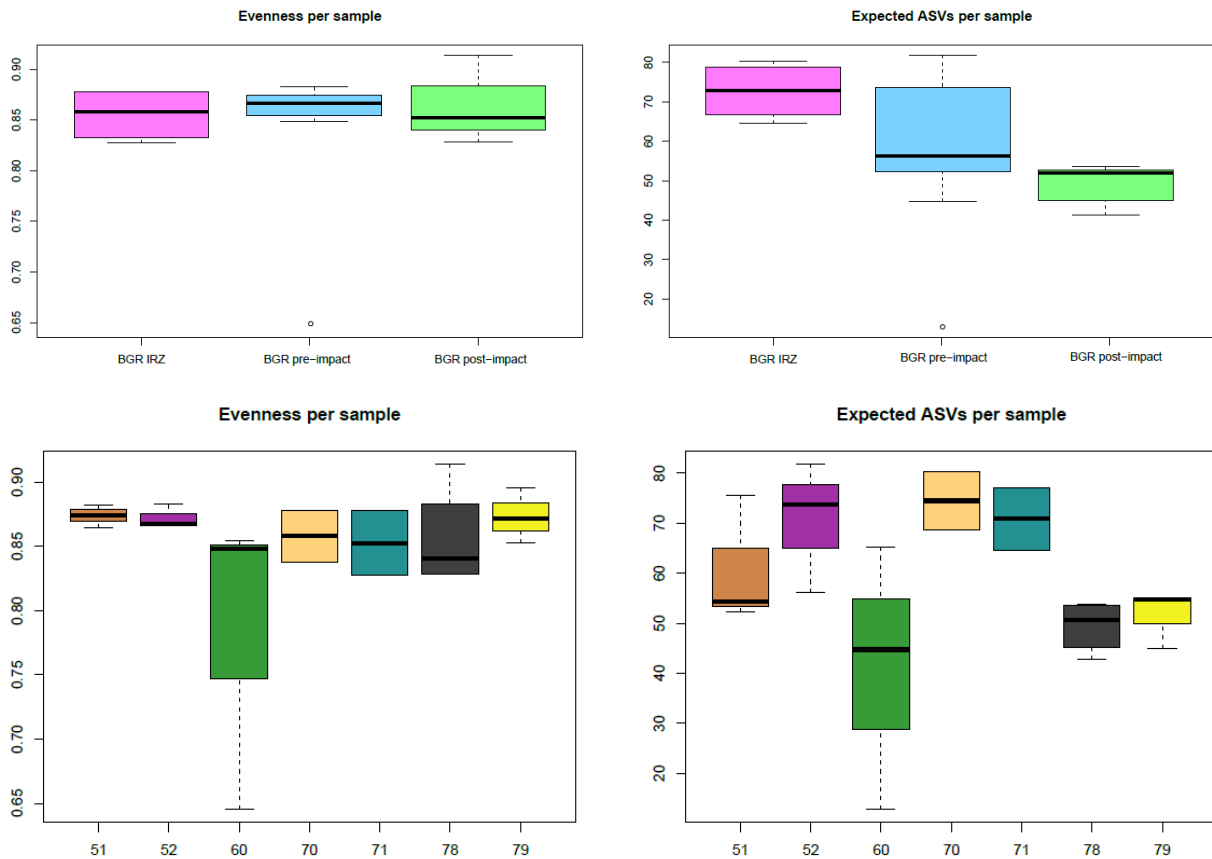


Abbildung II.12: Diversitätsanalysen, die die Evenness der Meiofauna-Gemeinschaft und die erwartete Anzahl von ASVs in der IRZ und im Testgebiet vor und nach der Störung (oben) sowie in allen untersuchten Stationen (unten) vergleichen.

Schlussfolgerung:

Die unter Verwendung des Metabarcoding-Ansatzes ausgewerteten Daten zu den Auswirkungen des Kollektortests deuten nicht nur auf den Verlust der Vielfalt der Meiofauna-Gemeinschaften in den Gebieten nach der Beeinträchtigung hin, in denen etwa die Hälfte der ASV nach dem Kollektortest in den Gebieten nach der Beeinträchtigung nicht mehr nachgewiesen werden konnte; auch die Zusammensetzung der Taxa könnte einen Wandel in den benthischen Gemeinschaften belegen, da in den betroffenen Gebieten der BGR eine hohe Anzahl einzigartiger Taxa gefunden wurde. Der drastische Rückgang der erwarteten Anzahl von ASVs an den Stationen nach der Störung ist ein weiterer Beleg für die enormen, entscheidenden ökologischen Auswirkungen einer Entfernung der polymetallischen Knollen auf die Verteilung und Zusammensetzung der Meiofauna. Obwohl die negativen Auswirkungen eindeutig sind, erschweren die hohe, natürliche Variabilität und die lückenhafte Verteilung der Meiofauna im CCZ-Gebiet eine exakte Bewertung der verlorenen Vielfalt mit Hilfe der Metabarcodierung; daher ist eine umfassende Untersuchung weiterer Proben der benthischen Fauna von entscheidender Bedeutung, um belastbare Aussagen zu erhalten, insbesondere da mit Hilfe des Metabarcodierungsansatzes, große Datenmengen relativ schnell verglichen werden können. Darüber hinaus würden weitere Untersuchungen auf niedrigerer taxonomischer Ebene unser Verständnis der Auswirkungen auf den Verlust bestimmter Taxa erheblich verbessern. Unter diesem Gesichtspunkt ist die Verwendung von DNA-Barcodes identifizierter Tiere von entscheidender Bedeutung und wird eine taxonomische Zuordnung mit einer höheren Auflösung ermöglichen, insbesondere im Hinblick auf seltene Organismen der Meiofauna.

e) Morphologische Untersuchung der Meiofauna im BGR-Testgebiet des Kollektors

Während der Expedition SO262 wurden 2018 mit dem Multicorer Proben im Gebiet des Kollektor-Tests genommen. Von jeder Station wurden Multicorer-Kerne als Baseline für eine Untersuchung der Meiofauna mit Metabarcoding verwendet, ebenso wie für MALDI-TOF MS. Zusätzlich wurden jedoch auch Corer für eine morphologische Betrachtung der Meiofauna auf Großgruppenebene verwendet.

Die Gesamtabundanz der Meiofauna im Kollektorgebiet schwankt zwischen 666 und 2060 Individuen pro Kern (Abbildung II.13). Das mit Abstand abundanteste Taxon ist Nematoda, gefolgt von den Copepoda (Abbildung II.13). Unter den anderen Taxa sind viele weitere wurmförmige Taxa wie beispielsweise Annelida und Gastrotricha, ebenso wie weitere Crustacea, beispielsweise Isopoda und Tantulocarida, aber auch andere Taxa wie Kinoryncha, Tardigrada und Loricifera.

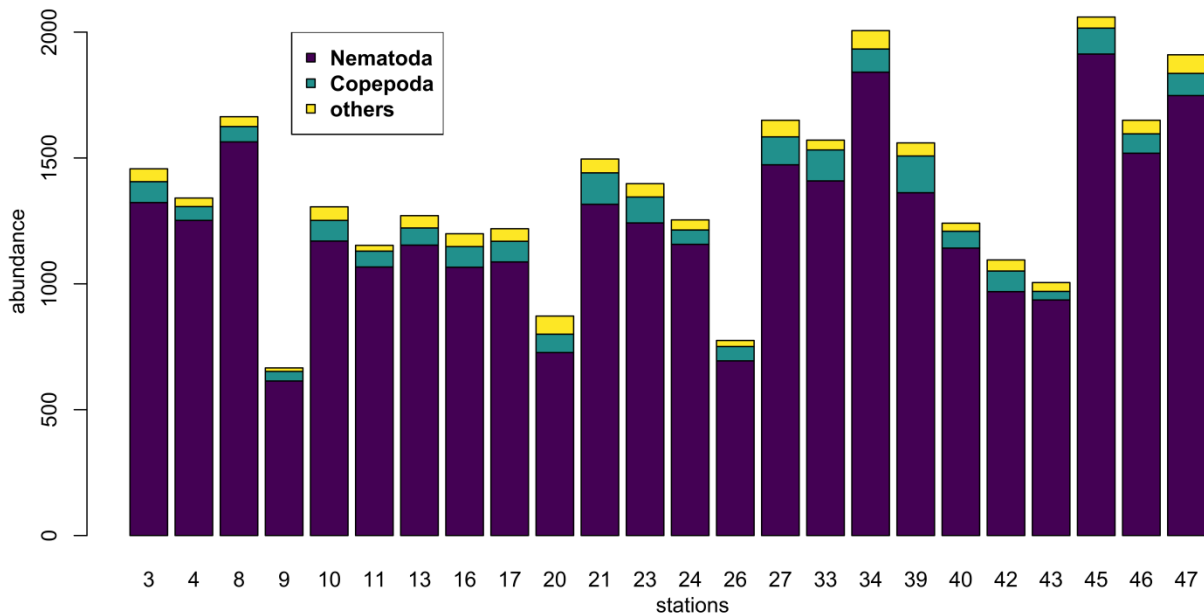


Abbildung II.13: Balkendiagramm der Meiofauna-Abundanzen pro Multicorer-Kern (0-5 cm) an 24 Stationen im Kollektor-Test-Gebiet im Jahr 2018.

Vergleicht man die Taxa-Zusammensetzung der einzelnen Stationen, lässt sich kein Einfluss der Wassertiefe auf die Zusammensetzung der Meiofaunagemeinschaft erkennen (Abbildung II.14). Nur vier von 36 Umweltparametern (Uhlenkott et al. 2021) korrelieren signifikant mit den Unterschieden innerhalb der Meiofauna-Gemeinschaft, darunter die Scherfestigkeit des Meeresbodens (shear strength) sowie die Schüttdichte (dry bulk density).

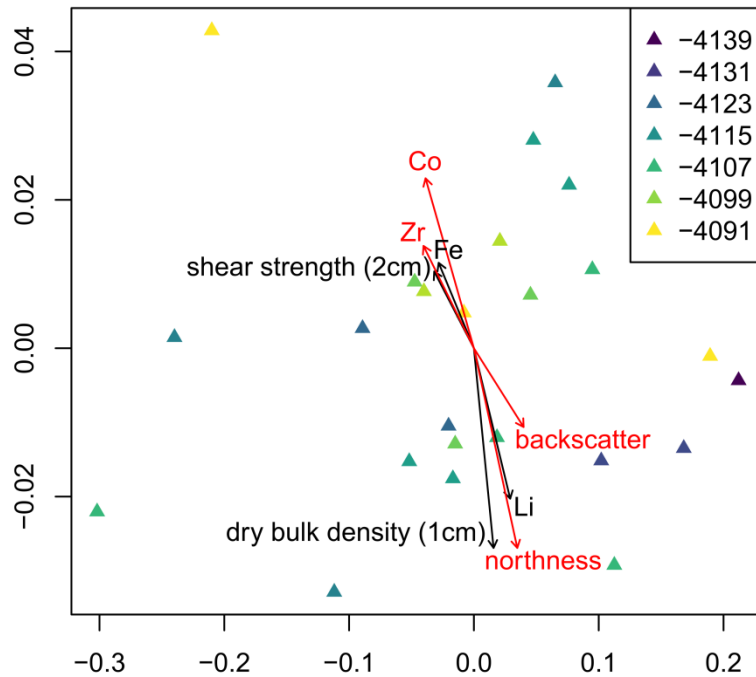


Abbildung II.14: Nicht-metrische multidimensionale Skalierung der Bray-Curtis Unähnlichkeit berechnet basierend auf der Meiofaunagemeinschaft auf Großgruppenebene für die Stationen, die im Kollektor-Test-Gebiet morphologisch untersucht wurden, die Farben der Punkte beziehen sich auf die Wassertiefe der Station; zusätzlich wurden vorliegende Umweltparameter (s. Uhlenkott et al. 2021) korreliert, die Vektoren beziehen sich auf den Einfluss des Parameters auf die Meiofaunagemeinschaft, die Farbe schwarz bedeutet höhere Signifikanz (≤ 0.05), die Farbe rot geringe Signifikanz (≤ 0.1), die Abkürzungen Co, Zr, Fe und Li beziehen sich auf das Vorkommen der Elemente Kupfer, Zirkonium, Eisen und Lithium in den polymetallischen Knollen.

f) Verbreitungsmodelle der Meio- und Megafauna

Die „rapid assessment“ Methoden, deren Anwendung wir in diesem Projekt untersucht haben, sind ein wichtiges Element, um die Auswirkungen von Störungen, wie sie z.B. durch das Dredge-Experiment und den Test des Knollenkollektor-Pre-Prototypen *Pantania II* hervorgerufen wurden, schnell und effektiv zu erfassen. Allerdings sind auch die mit diesen Methoden gewonnenen Daten nur punktuell; um diesem Problem zu begegnen, haben wir die Anwendung von Verbreitungsmodellen im Lizenzgebiet der BGR untersucht.

Eines der größten Probleme bei der Berechnung von Verbreitungsmodellen in der Tiefsee, stellt die geringe Verfügbarkeit von Umweltdaten dar, auf deren Grundlage die Verbreitung von Tieren modelliert werden kann. Da die frei verfügbaren Daten in unserem Forschungsgebiet nur eine geringe Auflösung von ~ 5 km (e.g. GEBCO 2014) aufweisen, konnten wir diese für eine Modellierung innerhalb des Lizenzgebietes der BGR nicht verwenden. Aus diesem Grund testeten wir die Verwendung von Bathymetrie (Wassertiefe, Steigung, Neigung der Steigung, verschiedene Topographie-Indizes) und Backscatter-Werten, die mit Echosounder-Systemen von der Meeresoberfläche gemessen wurden und in einer Auflösung von 100-120 m vorlagen.

Zugleich verwendeten wir den Algorithmus random forest (Breiman 2001), um die räumliche Verteilung von verschiedenen, aus Proben des Kastengreifers gewonnene Sediment- und Knollenvariablen, vorherzusagen. Diese Daten verwendeten wir, um auch die Abundanz und Diversität der Meiofauna vorherzusagen, ebenfalls mit dem random forest Algorithmus. Insgesamt wurden für unterschiedliche Meiofauna-Variablen unterschiedliche räumliche Verteilungen berechnet, das Ergebnis ist also kein reines Abbild der verwendeten Umweltparameter sondern eine differenziertere Verteilung.

Vergleicht man die berechnete räumliche Verteilung der Meiofauna-Abundanz im Referenzgebiet des Kollektortests, die mit unterschiedlichen Kombinationen an Umweltparametern berechnet wurde, ist das generelle Muster gleichbleibend (Abbildung II.15a-c); dasselbe gilt für die modellierte Diversität

in Form des Simpson Index (Abbildung II.15d-f) und die modellierte Abundanz des häufigsten Taxon Nematoda (Abbildung II.15g-i). Beruht die Berechnung lediglich auf Bathymetrie und Backscatter sind die Vorhersagen heterogener im Vergleich zu gleichmäßigeren Vorhersagen, wenn bei der Modellierung nur die berechneten Sediment- und Knollenparameter verwendet werden.

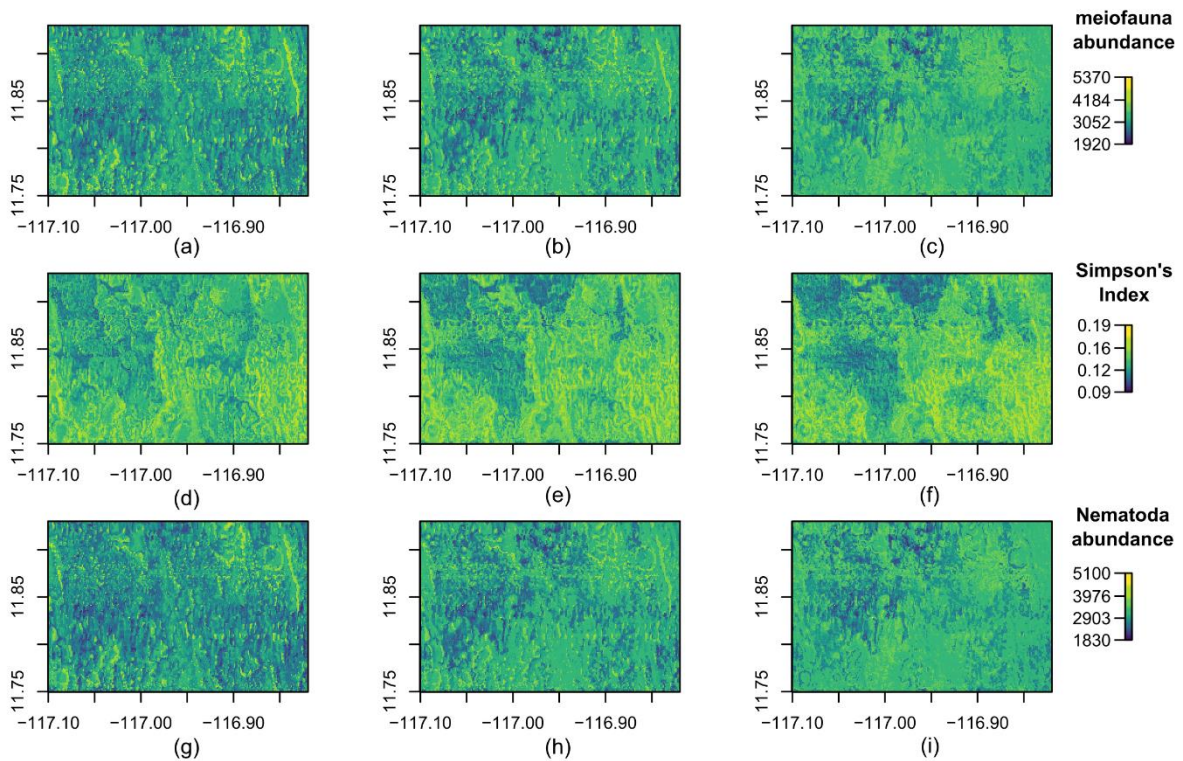


Abbildung II.15: Auf der Modellierung mit random forest basierende Verbreitungskarten des Referenzgebietes des Kollektor-Tests im Lizenzgebiet der BGR unter Verwendung von nur Bathymetrie und Backscatter (links), allen verfügbaren Prediktoren (Mitte) sowie nur Sediment- und Knollenvariablen. Die Karten zeigen die berechnete Meiofauna-Abundanz (a-c), Simpsons Diversitätsindex (d-f) und die Abundanz des Taxons Nematoda (g-i) (veröffentlicht in Uhlenkott et al. 2021).

In derselben Weise war es möglich, Unterschiede zwischen den Jahren 2013, 2014 und 2016 darzustellen, indem die Modelle jeweils nur die Meiofauna-Proben für die Modellierung verwendet werden, die in den jeweiligen Jahren beprobt wurden (Abbildung II.16). Während die berechnete Verteilung der Diversität in allen Jahren ähnlich bleibt (Abbildung II.16d-f), weisen die Verteilungen zwischen 2013 und 2014 bzw. 2016 eine negative Korrelation auf. Dieselbe Methode, die hier verwendet wird um Unterschiede zwischen den unterschiedlichen Jahren darzustellen, kann in Zukunft auch angewandt werden um die benthische Gemeinschaft vor und nach dem Kollektortest zu vergleichen.

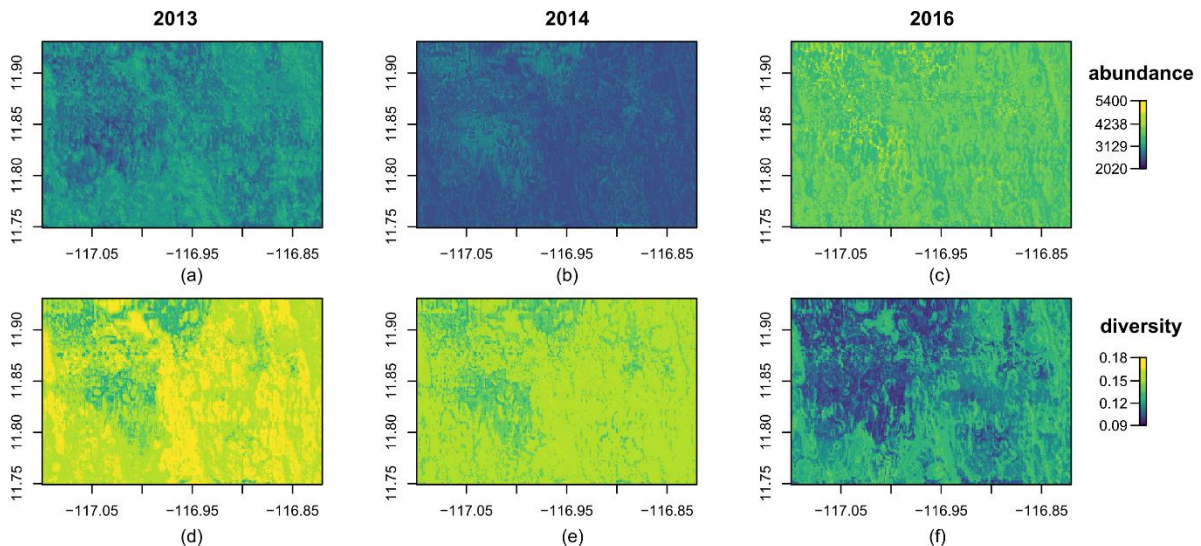


Abbildung II.16: Auf der Modellierung mit random forest basierende Verbreitungskarten des Referenzgebiets des Kollektor-Tests im Lizenzgebiet der BGR der Meiofauna-Abundanz (a-c) und des Simpson Index (d-f) unter der Verwendung der verfügbaren Meiofauna-Proben aus den Jahren 2013, 2014 und 2016 und aller verfügbarer Umweltparameter (veröffentlicht in Uhlenkott et al. 2021).

Eine weitere, von uns untersuchte Anwendungsmöglichkeit, ist die Verwendung der Verbreitungsmodelle um passende Referenzgebiete für das Monitoring von Störungen sowie passende Schutzgebieten zu finden. Dazu wurden die modellierten Verbreitungsdaten zu verschiedenen Tiergruppen ebenso wie die verfügbaren Umweltparameter für das gesamte Lizenzgebiet der BGR kombiniert, um ähnliche Gebiete zu identifizieren. Dazu wurde der Clustering-Algorithmus k-means verwendet, die passende Anzahl der Habitate bzw. Gemeinschaften wurde mithilfe des Calinski Kriteriums ausgewählt.

Betrachtet man die verschiedenen Gemeinschaften, die basierend auf der berechneten Verbreitung von 68 Morphotypen der Megafauna identifiziert wurden, lassen sich drei klar unterscheidbare Gemeinschaften identifizieren. Eine Megafauna-Gemeinschaft (Gemeinschaft 1) ist hauptsächlich im Gebiet von Seebergen und -hügeln zu finden (Abbildung II.17a), die zweite Gemeinschaft vor allem im östlichen Teil des Lizenzgebietes, während die dritte Gemeinschaft im Westen und in der Nähe der Seeberge dominiert ((Abbildung II.17a). Auch wenn das Gebiet basierend auf Meiofauna-Daten, Bathymetrie und Backscatter in Habitate eingeteilt wird, lassen sich ein westlicher Bereich, der von den Habitaten 3 und 4 dominiert wird, sowie ein östlicher Bereich, in dem vor allem die Habitate 1 und 2 zu finden sind, unterscheiden. Allerdings sind die berechneten Meiofauna-Habitate im Vergleich zu den Megafauna-Gemeinschaften deutlich fragmentierter und weniger klar getrennt.

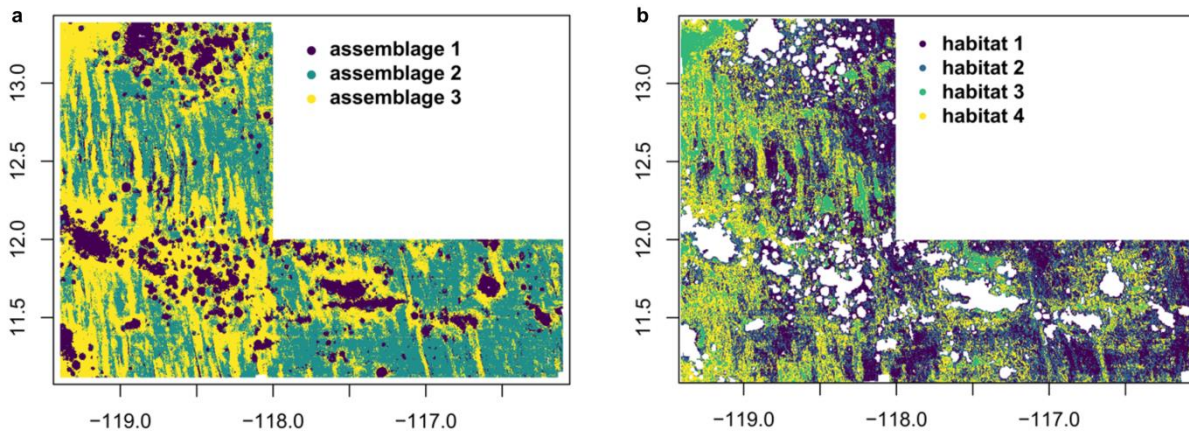


Abbildung II.17: Mit dem k-means Clusteralgorithmus berechnete Verbreitungskarten des Lizenzgebietes der BGR für die Exploration von polymetallischen Knollen von Megafauna-Gemeinschaften (a; veröffentlicht in Uhlenkott et al. 2022) und Meiofauna-Habitaten (b; verändert nach Uhlenkott et al. 2020).

g) Literatur

- Breiman L (2001) Random forests. *Mach Learn* 45:5–32. <https://doi.org/10.1023/A:1010933404324>
- Brix S, Osborn KJ, Kaiser S, Truskey SB, Schnurr SM, Brenke N, Malyutina M, Martinez PM (2020) Adult life strategy affects distribution patterns in abyssal isopods – implications for conservation in Pacific nodule areas. *Biogeosciences* 17: 6163–6184. <https://doi.org/10.5194/bg-17-6163-2020>
- Christodoulou M, O’ Hara T, Hugall A, Martínez Arbizu P (2019) Dark biodiversity in an abyssal mine field. *Current Biology* 29: 1-4. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2019.09.012>
- Christodoulou M, O’Hara T, Khodami S, Rodrigues CF, Hilario A, Vink A, Martínez Arbizu P (2020) Unexpected high abyssal ophiuroid diversity in polymetallic nodule fields of the Northeast Pacific Ocean, and implications for conservation. *Biogeosciences*, 17: 1845-1876. <https://doi.org/10.5194/bg-17-1845-2020>
- GEBCO (2014) The GEBCO_2014 Grid, version 20150318. In: Gen. Bathymetr. Chart Oceans. <http://www.gebco.net>. Accessed 2 Jul 2018
- Mohrbeck I, Horton T, Jażdżewska AM, Martínez Arbizu P (2021) DNA barcoding and cryptic diversity of deep-sea scavenging amphipods in the Clarion-Clipperton Zone (Eastern Equatorial Pacific). *Marine Biodiversity* 51: 26. <https://doi.org/10.1007/s12526-021-01170-3>
- Pons J, Barraclough TG, Gomez-Zurita J, et al (2006) Sequence-based species delimitation for the DNA taxonomy of undescribed insects. *Syst Biol* 55:595–609. <https://doi.org/10.1080/10635150600852011>
- Puillandre N, Lambert A, Brouillet S, Achaz G (2012) ABGD, Automatic Barcode Gap Discovery for primary species delimitation. *Mol Ecol* 21:1864–1877. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2011.05239.x>
- Ramirez-Llodra E, Brandt A, Danovaro R, et al (2010) Deep, diverse and definitely different: unique attributes of the world’s largest ecosystem. *Biogeosciences* 7:2851–2899. <https://doi.org/10.5194/bg-7-2851-2010>
- Renz J, Markhaseva EL, Laakmann S, et al (2021) Proteomic fingerprinting facilitates biodiversity assessments in understudied ecosystems: A case study on integrated taxonomy of deep sea copepods. *Mol Ecol Resour* 21:1936–1951. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.13405>
- Rossel S, Martínez Arbizu P (2019) Revealing higher than expected diversity of Harpacticoida (Crustacea:Copepoda) in the North Sea using MALDI-TOF MS and molecular barcoding. *Sci Rep* 9:9182. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-45718-7>

Rossel S, Martínez Arbizu P (2020) Unsupervised biodiversity estimation using proteomic fingerprints from MALDI-TOF MS data. *Limnol Oceanogr Methods* 18:183–195. <https://doi.org/10.1002/lom3.10358>

Rossel S, Uhlenkott K, Peters J, Vink A, Martínez Arbizu P (eingereicht bei Marine Biodiversity) Evaluating species richness using proteomic fingerprinting and DNA-barcoding – a case study on meiobenthic copepods from the Clarion Clipperton Fracture Zone

Uhlenkott K, Simon-Lledó E, Vink A, Martínez Arbizu P (2022) Investigating the benthic megafauna in the eastern Clarion Clipperton Fracture Zone (north-east Pacific) based on distribution models predicted with random forest. *Sci Rep* 12:8229. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-12323-0>

Uhlenkott K, Vink A, Kuhn T, et al (2021) Meiofauna in a potential deep-sea mining area - Influence of temporal and spatial variability on small scale abundance models. *Diversity* 13:3. <https://doi.org/10.3390/d13010003>

Uhlenkott K, Vink A, Kuhn T, Martínez Arbizu P (2020) Predicting meiofauna abundance to define preservation and impact zones in a deep-sea mining context using random forest modelling. *J Appl Ecol* 57:1210–1221. <https://doi.org/10.1111/1365-2664.13621>

2. der wichtigsten Positionen des zahlenmäßigen Nachweises

0824 Personalausgaben (320.739,17 €)

Zusätzlich zum Stammpersonal von Senckenberg wurden Mitarbeiter eingestellt um folgende Teilprojekte zu bearbeiten:

Erstellung einer Barcoding-Referenzbibliothek von Meiofauna Organismen mit besonderem Fokus auf Copepoda (Dr. Nancy Mercado Salas, Angelina Eichsteller)

Anwendung der Methode MALDI-TOF MS auf Meiofauna Organismen mit besonderem Fokus auf Copepoda (Katja Uhlenkott)

Erhebung von morphologischen Baseline-Daten der Meiofauna im deutschen Kollektor-Testgebiet (Lukas Münter)

0835 Vergabe von Aufträgen (9.000,00 €)

Die Sequenzierung der Tiere für die Referenz-Bibliothek als Auftrag an Fremdfirmen vergeben. Auch für die Überprüfung des Erfolgs der Methode MALDI-TOF MS wurden Tiere sequenziert.

0838 Verbrauchsmaterial (51.115,09 €)

Die Zuwendung wurde insbesondere für Verbrauchsmaterialien während der Fahrten SO-268 und IP-21 verwendet. Zusätzlich wurden Verbrauchsmaterialien für die Extraktion und Amplifikation von DNA der gesammelten Tiere verwendet, sowie für die Messungen mit MALDI-TOF MS.

0841 Transporte (21.467,54 €)

Die Zuwendung wurde für den Transport von Geräten und Arbeitsmaterialien für die Expeditionen verwendet, sowie jeweils auf dem Rückweg für den Transport der erhaltenen Proben.

0846 Reisekosten (46.241,34 €)

Der größte Teil der Reisekosten entstand durch die An- und Abreise, sowie Vorbereitung, der beiden Expeditionen. Dazu kamen Planungs- und Projekttreffen im Aus- und Inland.

Eigenmittel:

Neben der Vorhabenkoordination durch Prof. Dr. Pedro Martínez Arbizu waren mehrere weitere im Grundhaushalt von Senckenberg beschäftigte Personen an der erfolgreichen Durchführung des Projektes beteiligt. Dr. Sahar Khodami führte die Probenbearbeitung und Auswertung für das Metabarcoding durch. Dr. Magdalini Christodoulou arbeitete an einer Erweiterung der DNA-Referenzbibliothek von DNA-Barcodes mit größeren Organismen. Mehrere Techniker waren in die Planung und Durchführung der Expedition, sowie in die spätere Bearbeitung der Proben eingebunden. Insgesamt betrug der Wert der bereitgestellten Arbeitsleistung (geschätzt bei 6000 € Gehalt und 45 Personenmonaten) 270.000,00 €.

Zusätzlich stellte Senckenberg mit den Geräten Multicorer, Kastengreifer und Epibenthos-Schlitten sowie dem MiSeq NGS Sequencer, dem MALDI-TOF MS und dem DNA-Labor Infrastruktur im Wert von 640.000,00 € bereit.

3. der Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit

Trotz der zeitlichen Verzögerungen durch den verschobenen Kollektortest sowie die Auswirkungen der Pandemie konnten die im Antrag angegebenen Meilensteine und Ziele erreicht werden. Die Zuwendung war angemessen, da die Ziele ohne zusätzliches Personal, sowie Verbrauchsmaterialien und Aufträge nicht hätte erreicht werden können. Es wurden bereits einige Ergebnisse publiziert, weitere Publikationen werden im Laufe des Jahres 2022 folgen.

4. des voraussichtlichen Nutzens

(...insbesondere der Verwertbarkeit des Ergebnisses im Sinne des fortgeschriebenen Verwertungsplans)

h) Wirtschaftlicher Nutzen

Sowohl das Metabarcoding als auch MALDI-TOF MS haben sich als nützliche Methoden erwiesen, die in der Tiefsee angewandt werden können. Im Zusammenhang mit Monitoring der Tiefseefauna im Falle von Tiefseebergbau ermöglichen beide Methoden eine deutlich schnellere und günstigere Erfassung der Biodiversität als traditionelle morphologische Methoden. Während MALDI-TOF MS insbesondere für eine schnelle, quantitative Erfassung geeignet ist, ermöglicht das Metabarcoding eine sehr schnelle qualitative und standardisierte Erfassung von einer großen Anzahl benthischer Proben.

i) Wissenschaftlich- technischer Nutzen

Die DNA-Barcodes von Tiefsee-Organismen, die im Rahmen der Referenzbibliothek für das Metabarcoding sequenziert wurden, wurden bzw. werden alle in die Datenbank BOLD geladen. Dort stellen sie eine signifikante Erweiterung der Verfügbarkeit von Tiefseeorganismen dar und ermöglichen dadurch die Identifikation von mehr Tiefsee-Arten anhand ihres DNA-Barcodes.

5. des während der Durchführung des Vorhabens dem ZE bekannt gewordenen Fortschritts auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen

Obwohl im Verlauf des Vorhabens mehrere Artikel über Metabarcoding in der Tiefsee publiziert wurden (e.g. (Brandt et al. 2019, <https://doi.org/10.1101/836080>; Macheriotou et al. 2020, <https://doi.org/10.1098/rspb.2019.2666>), stand keine dieser Publikationen in einem direkten Zusammenhang mit einem Störungsexperiment. Es gab keine neuen Erkenntnisse zur Anwendung von MALDI-TOF MS in der Tiefsee.

6. der erfolgten oder geplanten Veröffentlichungen des Ergebnisses

a) Artikel in internationalen Fachzeitschriften

Veröffentlicht:

Christodoulou M, O' Hara T, Hugall A, Martínez Arbizu P (2019) Dark biodiversity in an abyssal mine field. *Current Biology* 29: 1-4. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2019.09.012>

Sánchez N, Pardo F, Martínez Arbizu P (2019) Deep-sea Kinorhyncha diversity of the polymetallic nodule fields at the Clarion-Clipperton Fracture Zone (CCZ). *Zoologischer Anzeiger* 282: 88-105. <https://doi.org/10.1016/j.jcz.2019.05.007>

Bonifácio P, Martínez Arbizu P, Menot L (2020) Alpha and beta diversity patterns of polychaete assemblages across the nodule province of the eastern Clarion-Clipperton Fracture Zone (equatorial Pacific). *Biogeosciences* 17: 865-886. <https://doi.org/10.5194/bg-17-865-2020>

Brix S, Osborn KJ, Kaiser S, Truskey SB, Schnurr SM, Brenke N, Malyutina M, Martinez PM (2020) Adult life strategy affects distribution patterns in abyssal isopods – implications for conservation in Pacific nodule areas. *Biogeosciences* 17: 6163–6184. <https://doi.org/10.5194/bg-17-6163-2020>

Christodoulou M, O'Hara T, Khodami S, Rodrigues CF, Hilario A, Vink A, Martínez Arbizu P (2020) Unexpected high abyssal ophiuroid diversity in polymetallic nodule fields of the Northeast Pacific Ocean, and implications for conservation. *Biogeosciences*, 17: 1845-1876. <https://doi.org/10.5194/bg-17-1845-2020>

Cuvelier D, Ribeiro PA, Ramalho SP, Kersken D, Martínez Arbizu P, Colaço A (2020) Are seamounts refuge areas for fauna from polymetallic nodule fields? *Biogeosciences*, 17: 2657-2680. <https://doi.org/10.5194/bg-17-2657-2020>

Ingels J, Vanreusel A, Pape E, Pasotti F, Martínez Arbizu P, Macheriotou L, Sørensen MV, Edgcomb VP, Sharma J, Sánchez N, Homoky WB, Leduc D, Gooday AJ, Pawlowski J, Dolan J, Schratzberger M, Gollner S, Schoenle A, Arndt H, Woulds C, Zeppilli D (2020) Ecological variables for deep-ocean monitoring must include microbiota and meiofauna for effective conservation. *Nature Ecology & Evolution*, 5, 27–29 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41559-020-01335-6>

Khodami, S., Mercado-Salas, N. F. and Martinez Arbizu, P. (2020) Genus level molecular phylogeny of Aegisthidae Gisbrecht, 1893 (Copepoda: Harpacticoida) reveals morphological adaptations to deep-sea and pelagic habitats. *BMC Evolutionary Biology*, 20: 36. <https://doi.org/10.1186/s12862-020-1594-x>

Jądzewska AM, Brandt A, Martínez Arbizu P, Vink A (2021) Exploring the diversity of the deep sea — four new species of the amphipod genus *Oedicerina* described using morphological and molecular methods. *Zoological Journal of the Linnean Society* 194: 181–225. <https://doi.org/10.1093/zoolinnean/zlab032>

Uhlenkott K, Vink A, Kuhn T, Martínez Arbizu P (2020) Predicting meiofauna abundance to define preservation and impact zones in a deep-sea mining context using random forest modelling. *Journal of Applied Ecology* 57:1210–1221. <https://doi.org/10.1111/1365-2664.13621>

Kaiser S, Kihara TC, Brix S, Mohrbeck I, Janssen A, Jennings RM (2021) Species boundaries and phylogeographic patterns in new species of *Nannoniscus* (Janiroidea: Nannoniscidae) from the equatorial Pacific nodule province inferred from mtDNA and morphology. *Zoological Journal of the Linnean Society* 193: 1020-1071. <https://doi.org/10.1093/zoolinnean/zlaa174>

Laming SR, Christodoulou M, Martínez Arbizu P, Hilário A (2021) Comparative reproductive biology of deep-sea ophiuroids inhabiting polymetallic-nodule fields in the Clarion-Clipperton Fracture Zone. *Frontiers in Marine Science* 8:523. <https://doi.org/10.3389/fmars.2021.663798>

Lejzerowicz F, Gooday AJ, Barrenechea Angeles I, Cordier T, Morard R, Apothéoz-Perret-Gentil L, Lins L, Menot L, Brandt A, Levin LA, Martínez Arbizu P, Smith CR, Pawlowski J (2021) Eukaryotic biodiversity and spatial patterns in the Clarion-Clipperton Zone and other abyssal regions: Insights from sediment DNA and RNA metabarcoding. *Frontiers in Marine Science* 8:671033. <https://doi.org/10.3389/fmars.2021.671033>

Lins L, Zeppilli D, Menot L, Michel LN, Bonifácio P, Brandt M, Pape E, Rossel S, Uhlenkott K, Macheriotou L, Bezerra TN, Sánchez N, Alfaro-Lucas JM, Martínez Arbizu P, Kaiser S, Murakami C, Vanreusel A (2021) Towards a reliable assessment of potential ecological impacts of deep-sea polymetallic nodule mining on abyssal infauna. *Limnology and Oceanography: Methods* 19(9):625-650. <https://doi.org/10.1002/lom3.10448>

Mohrbeck I, Horton T, Jażdżewska AM, Martínez Arbizu P (2021) DNA barcoding and cryptic diversity of deep-sea scavenging amphipods in the Clarion-Clipperton Zone (Eastern Equatorial Pacific). *Marine Biodiversity* 51: 26. <https://doi.org/10.1007/s12526-021-01170-3>

Uhlenkott K, Vink A, Kuhn T, et al (2021) Meiofauna in a potential deep-sea mining area - Influence of temporal and spatial variability on small scale abundance models. *Diversity* 13:3. <https://doi.org/10.3390/d13010003>

Cordier T, Barrenechea Angeles I, Henry N, Lejzerowicz F, Berney C, Morard R, Brandt A, Cambon-Bonavita MA, Guidi L, Lombard F, Martínez Arbizu P, Massana R, Orejas C, Poulain J, Smith CR, Wincker P, Arnaud-Haond S, Gooday AJ, de Vargas C, Pawlowski J (2022) Patterns of eukaryotic diversity from the surface to the deep-ocean sediment. *Science Advances* 8(5): eabj9309. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abj9309>

Uhlenkott K, Simon-Lledó E, Vink A, Martínez Arbizu P (2022) Investigating the benthic megafauna in the eastern Clarion Clipperton Fracture Zone (north-east Pacific) based on distribution models predicted with random forest. *Scientific Reports* 12:8229. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-12323-0>

In Vorbereitung:

Christodoulou, M., de Grave, S., Vink, A. and Martinez Arbizu, P. (accepted) Groundtruthing the taxonomic assignment of Deep-sea decapod crustaceans collected from polymetallic nodule fields of the East Pacific Ocean Ocean using an integrative approach. *Marine Biodiversity*.

Sánchez N, González-Casarrubios A, Cepeda D., Khodami S, Pardos F, Vink A, Martínez Arbizu P (in press) Diversity and distribution of Kinorhyncha in abyssal polymetallic nodule areas of the Clarion-Clipperton Fracture Zone and the Peru Basin, East Pacific Ocean, with the description of three new species and notes on their intraspecific variation. *Marine Biodiversity*. <https://doi.org/10.1007/s12526-022-01279-z>

Rossel S, Uhlenkott K, Peters J, Vink A, Martínez Arbizu P (submitted to *Marine Biodiversity*) Evaluating species richness using proteomic fingerprinting and DNA-barcoding – a case study on meiobenthic copepods from the Clarion Clipperton Fracture Zone

Uhlenkott K, Gerdes K, Vink A, Martínez Arbizu P (submitted to *Marine Biodiversity*) Megafauna of the Clarion Clipperton Fracture Zone: A review and case study of benthic communities, distribution patterns and structuring factors with regard to mining impacts and environmental management

Uhlenkott K, Simon-Lledo S, Vink A, Martínez Arbizu P (submitted to *Marine Biodiversity*) Habitat heterogeneity enhances megafaunal biodiversity at bathymetric elevations in the Clarion Clipperton Fracture Zone

Thiel R, Christodoulou M, Pogonoski JJ, Appleyard SA, Weddehage T, Vink A, Uhlenkott K, Martínez Arbizu P (submitted to *Marine Biodiversity*) Comparative application of morphological analysis and

DNA barcoding confirms the identity of *Ipnops meadi* Nielsen, 1966 (Aulopiformes: Ipnopidae) from the Clarion-Clipperton Zone (CCZ)

b) Vorträge und Poster bei internationalen Konferenzen und Instituten

Uhlenkott K, Rossel S, Peters J, Vink A, Martínez Arbizu P: Investigating meiobenthic copepods from the Clarion Clipperton Fracture Zone with MALDI-TOF MS and DNA-barcoding. 25-30 Juli 2022, Online International Conference on Copepoda (eICOC).

Uhlenkott K, Vink A, Kuhn T, Gillard B, Simon-Lledó E, Martínez Arbizu P: Distribution modelling with random forest in a potential deep-sea mining area. 12-17 September 2021, 16th Deep Sea Biology Symposium, Brest, France.

c) Berichte

Vink A und wissenschaftliche Fahrtteilnehmer (im Druck) MANGAN 2021 (IP-21). Fahrtbericht, Bundesanstalt für Geowissenschaften und Rohstoffe, Hannover.

Haeckel M, Linke P und wissenschaftliche Fahrtteilnehmer (2021) SO268 Assessing the impacts of nodule mining on the deep-sea environment, nodule monitoring. Fahrtbericht, GEOMAR Helmholtz-Zentrum für Ozeanforschung, Kiel, 802 S.

Uhlenkott K, Rossel S, Khodami S, Mercado-Salas N, Eichsteller A, Martínez Arbizu P und Workshop-Teilnehmende (2021) Rapid assessment methods for baseline studies and impact assessment in the Clarion Clipperton Fracture Zone. Workshop Report, Senckenberg am Meer, Wilhelmshaven, 12 S.

Korfhage S (2019) COI and SSU reference library for meiobenthic nematodes in the Mining Impact Reference Area in the German Claim of the Clarion Clipperton Fracture Zone. Bachelorarbeit, Carl-von-Ossietzky Universität Oldenburg, 36 S.

Liechtenstein H (2019) COI and SSU reference library for meiobenthic nematods in the Mining Impact Trial Area in the German Claim of the Clarion Clipperton Fracture Zone. Bachelorarbeit, Carl-von-Ossietzky Universität Oldenburg, 38 S.