

**Biochemie und Physiologie der  
Sulfatreduktion  
in der anaeroben Oxidation von Methan**

**Dissertation**

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der  
Naturwissenschaften  
– Dr. rer. nat. –

Dem Fachbereich Biologie/Chemie der  
Universität Bremen vorgelegt von

**Mirko Basen**

Bremen 2009



Diese Arbeit wurde von Februar 2005 bis September 2009 am Max-Planck-Institut für Marine Mikrobiologie in Bremen angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Friedrich Widdel, Bremen

2. Gutachter: Prof. Dr. Bernhard Schink, Konstanz

# INHALTSVERZEICHNIS

## Abkürzungsverzeichnis

<b>Zusammenfassung</b>	<b>1</b>
<b>A Einleitung</b>	<b>3</b>
<b>1. Methan – Eigenschaften, Vorkommen, Quellen und Senken</b>	<b>3</b>
<b>2. Methanogenese</b>	<b>5</b>
<b>3. Sulfatreduktion</b>	<b>10</b>
<b>4. Syntrophie und extrazellulärer Elektronentransfer</b>	<b>14</b>
<b>5. Anaerobe Oxidation von Methan (AOM)</b>	<b>19</b>
<b>6. Ziele der Arbeit</b>	<b>26</b>
<b>B Material und Methoden</b>	<b>27</b>
<b>1. Mikrobiologische Methoden</b>	<b>27</b>
1.1 Medien	27
1.2 AOM-Kulturen	27
1.3 Reinkulturen	29
1.3 Anreicherungs- und Isolierungsversuche	30
1.4 Inkubationsexperimente zum Mechanismus der AOM	31
1.5 Kokultur-Experimente mit Zellsuspensionen	32
1.6 Versuche zum Elektronentransfer in einer elektrochemischen Zelle	33
1.7 Semi-kontinuierliche Kultivierung von TMA- und Methanol-abbauenden methanogenen Konsortien	36
<b>2. Analytische Methoden</b>	<b>37</b>
2.1 Trockengewichtsbestimmung	37
2.2 Gaschromatographie	37
2.3 Bestimmung von Sulfid	37
2.4 Bestimmung von Eisen	38
2.5 Bestimmung von Fettsäuren, Zuckern und Alkoholen per HPLC	38
2.6 Bestimmung von Sulfat	38
2.7 Bestimmung der AOM mittels des Umsatzes von $^{14}\text{CH}_4$ zu $^{14}\text{CO}_2$	38



<b>3. Biochemische Methoden</b>	<b>40</b>
3.1 Zellaufschluß	40
3.2 Proteinreinigung und -analyse	40
3.3 Bestimmung von Proteinkonzentrationen und von Enzymaktivitäten	41
3.4 Analyse der Cytochrome	42
<b>4. Molekularbiologische Methoden</b>	<b>42</b>
4.1 DNA-Extraktion	42
4.2 Amplifikation von DNA-Fragmenten	43
4.3 Klonierung und Transformation	44
4.4 Sequenzierung und Sequenzanalyse	44
4.5 Fluoreszenz- <i>in situ</i> -Hybridisierung (FISH)	45
<b>5. Thermodynamische Berechnungen</b>	<b>46</b>
<b>C Ergebnisse und Diskussion</b>	<b>48</b>
<b>1. Abundante Enzyme für die Sulfatreduktion in mikrobiellen Matten aus dem Schwarzen Meer</b>	<b>48</b>
1.1 Charakterisierung der mikrobiellen Matten aus dem Schwarzen Meer	48
1.2 Aktivitäten der Enzyme für die Sulfatreduktion in den mikrobiellen Matten	52
1.3 Reinigung und Charakterisierung von Sat, Apr und Dsr	55
1.4 Phylogenie der abundanten Enzyme der Sulfatreduktion	61
1.5 Ist AOM ein syntropher Prozess? – Aufschlüsse durch die Charakterisierung der abundanten Enzyme für die Sulfatreduktion	66
<b>2. Studien zum möglichen extrazellulären Elektronentransfer in der AOM</b>	<b>68</b>
2.1 Reduzierte Kohlenstoffverbindungen und Wasserstoff als potentielle Intermediate der AOM	68
2.2 Potentielle Elektronenüberträger in der AOM	73
2.3 Elektrochemische Zellen zur Untersuchung der AOM	85
2.4 Isolierung von SRB	92
<b>3. Theoretische Überlegungen und Ausblick</b>	<b>94</b>
<b>D Literatur</b>	<b>97</b>
<b>E Publikationen</b>	<b>117</b>

## Abkürzungsverzeichnis

ANME	Anaerobe methanotrophe Archaeen
AOM	Anaerobe Oxidation von Methan
Apr	APS-Reduktase
APS	Adenosin-5'-phosphosulfat
AQDS/AH <sub>2</sub> QDS	Anthrachinon-2,6-disulfonat (oxidierte/reduzierte Form)
atm	Atmosphäre (1 atm = 1,013 × 10 <sup>5</sup> Pa)
BES	Bromoethansulfonat/-sulfonsäure
CoA, CoM, CoB	Coenzym A, Coenzym M, Coenzym B
Dsr	Dissimilatorische Sulfitreduktase
DSS	SRB aus der <i>Desulfosarcina/Desulfococcus</i> -Gruppe
dw	Trockenmasse
EPS	Extrazelluläre polymere Substanzen
Fd	Ferredoxin
H <sub>4</sub> MPT / H <sub>4</sub> SPT	Tetrahydromethanopterin / Tetrahydrosarcinapterin
kDa	Kilodalton
MFC	Mikrobielle Brennstoffzelle („microbial fuel cell“)
MV	Schlammvulkan („mud vulcano“)
MW	Mittelwert
NHE	Standardwasserstoffelektrode ( $E^{\circ} [\text{H}_2 / 2\text{H}^+] = 0 \text{ mV}$ )
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
pers. Mitt.	persönliche Mitteilung
ppmv/ppbv	Anteile pro 1 Million/1 Milliarde Volumen-Anteile
RV	Forschungsschiff („Research Vessel“)
SA	Standardabweichung
Sat	Sulfat-Adenylyl-Transferase (ATP-Sulfurylase)
sp./spp.	Spezies (singular/plural)
SRB	Sulfatreduzierende Bakterien
Tg	Teragramm (=10 <sup>12</sup> Gramm)
TMA	Trimethylamin
v/v	Volumenprozent („volume per volume“)

## Zusammenfassung

Die anaerobe Oxidation von Methan (AOM) mit Sulfat als Elektronenakzeptor ist eine bedeutende Reaktion beim Abbau des Treibhausgases Methan aus marinen Sedimenten. AOM wird von Konsortien aus anaeroben methanotrophen Archaeen (ANME) und Deltaproteobakterien katalysiert, wobei der genaue Stoffwechselweg aber weitgehend ungeklärt ist. Wahrscheinlich aktivieren ANME Archaeen das Methan mit Hilfe des Enzyms Methyl-Coenzym M-Reduktase, d.h. sie kehren den letzten Schritt der Methanbildung um. Über die Biochemie der Sulfatreduktion hingegen ist wenig bekannt.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Methan-abhängige Sulfatreduktion in mikrobiellen Matten aus dem Schwarzen Meer, einer natürlichen Anreicherung von ANME-2 und Bakterien aus der *Desulfosarcina/Desulfococcus* (DSS)-Gruppe, wahrscheinlich über den bekannten Reaktionsweg verläuft. Dafür spricht, dass die drei Schlüsselenzyme der Sulfatreduktion, ATP-Sulfurylase (Sat), APS-Reduktase (Apr) und dissimilatorische Sulfitreduktase (Dsr) zu den abundanten Enzymen im Extrakt der untersuchten mikrobiellen Matten gehörten. Weiterhin sind die gemessenen *in vitro*-Aktivitäten der Sat und der Apr hoch genug, um die AOM-Rate zu erklären. Die partiellen Aminosäuresequenzen der drei abundanten Proteine sind ähnlich zu denen der homologen Proteine aus Deltaproteobakterien, was die Hypothese unterstützt, dass sie in den bakteriellen Partnern lokalisiert sind.

Zusätzlich wurden verschiedene Hypothesen getestet, wie AOM in einer syntrophen Interaktion zwischen ANME und SRB katalysiert werden könnte. Dabei wurden die grundsätzlichen Möglichkeiten des extrazellulären Transfers von Reduktionsäquivalenten i) über reduzierte Kohlenstoffverbindungen bzw. über Wasserstoff, ii) über redox-aktive Elektronenüberträger und iii) im direkten Zell-Zell-Kontakt berücksichtigt. In Übereinstimmung mit vorangegangenen Arbeiten konnten Formiat, Wasserstoff, Acetat und Methanol als Intermediate ausgeschlossen werden. Darüber hinaus fand auch kein extrazellulärer Elektronentransfer über Methanthiol als Zwischenprodukt statt. Weitere Thiole wie Cystein bzw. Homocystein konnten als Elektronenüberträger ebenso ausgeschlossen werden. Sie stimulierten nicht die Sulfatreduktion in Abwesenheit von Methan. Vermutlich findet auch kein Elektronentransfer über ein Schwefel/Sulfid-Zyklus statt, da die AOM-Kulturen in Anwesenheit eines Schwefelreduzierers und eines durch diesen verwertbaren Elektronendonators kein Sulfid produzierten. Weitere bekannte Elektronenüberträger wie Anthrachinone und Flavine inhibierten die AOM schon in einer niedrigen Konzentration von 100  $\mu\text{M}$ . Sie sind daher wahrscheinlich ebenfalls nicht in den

extrazellulären Elektronentransfer involviert. In Experimenten mit mikrobiellen Matten aus dem Schwarzen Meer in einer neu entwickelten elektrochemischen Zelle konnte keine Methan-abhängige Abgabe von Elektronen an Graphitelektroden festgestellt werden, womit weiterhin kein Hinweis auf eine direkte Elektronenübertragung vorliegt.

### A Einleitung

Während man in den letzten Jahren über die Verbreitung der AOM und die beteiligten Organismen gute Kenntnisse gewonnen hat, ist über die Biochemie des Prozesses wenig bekannt. AOM wurde unter Laborbedingungen etabliert, und das Wachstum der Organismen konnte gezeigt werden. Reinkulturen oder axenische Kokulturen der Organismen existieren allerdings derzeit noch nicht. Metagenomische und biochemische Studien konzentrierten sich auf die beteiligten Archaeen. Diese sind verwandt mit den methanogenen Archaeen und oxidieren das Methan. Daher wurden sie als anaerobe methanotrophe Archaeen (ANME) bezeichnet. Die Physiologie der bakteriellen Partner wurde hingegen weniger untersucht. Sie sind phylogenetisch sehr nah verwandt mit sulfatreduzierenden Bakterien (SRB), bilden innerhalb der Deltaproteobakterien eigene Gruppen, und katalysieren daher vermutlich die Sulfatreduktion. Eine verbreitete Hypothese beschreibt AOM als einen syntrophen Prozess, bei dem ANME Methan in einer Art Umkehrung der Methanbildung oxidieren, und SRB die Reduktionsäquivalente aus der Methanoxidation zur Reduktion von Sulfat nutzen. Andererseits wurde bisher auch nicht ausgeschlossen, dass kein extrazellulärer Transfer von Reduktionsäquivalenten (Elektronen) stattfindet und die Archaeen selbst Sulfat reduzieren; die assoziierten Bakterien würden in diesem Fall als Kommensalen leben. Im Fokus dieser Arbeit standen daher die Biochemie der Sulfatreduktion in der AOM und der mögliche extrazelluläre Elektronentransfer zwischen ANME und SRB.

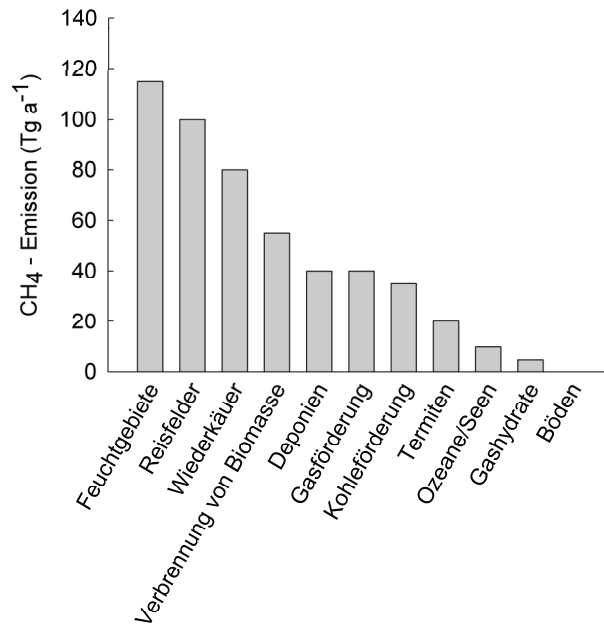
#### 1. Methan – Eigenschaften, Vorkommen, Quellen und Senken

Methan ( $\text{CH}_4$ ) ist die einfachste und am stärksten reduzierte Form organischen Kohlenstoffs und gehört zu den Kohlenwasserstoffen. Das zentrale Kohlenstoffatom bildet gleich lange Bindungen zu den vier Wasserstoffatomen, die in gleichem Winkel zueinander angeordnet sind ( $\text{sp}^3$ -Hybridisierung), so dass das Molekül die Form eines idealen Tetraeders besitzt. Methan ist das unreaktivste Alkan, da i) es eine hohe Ionisierungsenergie besitzt, was die Abspaltung eines Elektrons erschwert, ii) die C–H-Bindungen stark sind und iii) die Abspaltung eines Hydrids ( $\text{H}^-$ ) aufgrund der geringen Stabilität des Methyl-Kations schwierig ist (Crabtree 1995). Methan ist geruchlos, nicht toxisch und besitzt einen geringen Siedepunkt von  $-161,6^\circ\text{C}$ . Seine Löslichkeit in Meerwasser beträgt ca. 1,4 mM bei  $12^\circ\text{C}$  und einem Partialdruck von 1 atm (Yamamoto et al. 1976).

Methan ist mit einem Anteil von üblicherweise über 80% der Hauptbestandteil von Erdgas (Crabtree 1995). Große Methanvorräte lagern zudem in Form von Methan-

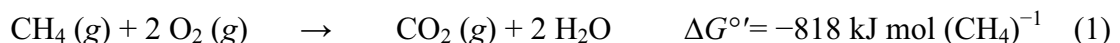
Gashydraten in den Sedimenten des Meeres und von Seen unterhalb einer Wassertiefe von 300 m sowie in Permafrostböden (Archer 2007; Kvenvolden 2002). Gashydrate sind kristalline Strukturen, in denen die Gasmoleküle von einem Käfig aus Wassermolekülen umgeben sind (Clathrate), die sich bei hohem Partialdruck eines Gases und bei tiefen Temperaturen bilden (Dickens 2003). Methan ist das wichtigste organische Spurengas in der Atmosphäre. Da es pro Molekül 21-mal soviel Infrarotstrahlung absorbiert wie CO<sub>2</sub>, ist es zudem das zweitwichtigste anthropogene Treibhausgas. Seine Konzentration in der Atmosphäre wird bestimmt durch die terrestrischen und marinen Emissionen (netto ca. 500 Tg pro Jahr). Diese stehen zur Zeit etwa im Gleichgewicht mit der größten atmosphärischen Senke, der Reaktion mit dem durch Photolyse entstehenden Hydroxy-Radikal ( $\bullet$ OH) (Reeburgh 2007). Seit der vorindustriellen Zeit hat sich die Methankonzentration mehr als verdoppelt und betrug 2005 1774 ppbv (Forster et al. 2007). Vermutlich aufgrund des Rückgangs anthropogener Emissionen in den späten 80er und frühen 90er Jahren steigt die Methankonzentration seit 1999 nur noch sehr langsam (Bousquet et al. 2006).

Etwa 10% des Methans entsteht chemisch, aus Kerogen oder durch die Reduktion von CO<sub>2</sub> (Etiope & Klusman 2002). Der überwiegende Anteil des Methans, etwa 90%, ist biogen und wird als Endprodukt des anaeroben Abbaus organischer Substanz gebildet (Schink 1997). Daher sind anoxische Habitate wie Feuchtgebiete und Reisfelder sowie die Verdauungstrakten von Wiederkäuern bedeutende Quellen für Methan (Abb.1). Methan wird zudem bei der Verbrennung von Biomasse, auf Deponien und bei der Gas- und Kohleförderung freigesetzt, so dass insgesamt 70% der Netto-Methanemission auf anthropogene Einflüsse zurückgehen. In einer neueren Publikation wird von der Methan-Freisetzung durch Pflanzen unter oxidischen Bedingungen berichtet (Keppler et al. 2006). Die Größenordnung dieser Methan-Emissionen wird kontrovers diskutiert (Brüggemann et al. 2009; Messenger et al. 2009 und Referenzen darin). Das Methan wird vermutlich unter UV-Strahlung aus den Methyl-Gruppen des Pektins freigesetzt (Keppler et al. 2008; McLeod et al. 2008; Messenger et al. 2009).



**Abbildung 1.** Netto-Emission von Methan in Tg pro Jahr. Daten aus Reeburgh (1996).

Der Großteil des unter anoxischen Bedingungen produzierten Methans wird bereits oxidiert, bevor es in die Atmosphäre gelangt. Die aerobe Oxidation von Methan entfernt weltweit, meist in Böden und Süßgewässern, etwa 600 Tg CH<sub>4</sub> pro Jahr. Die Reaktion ist stark exergon (Gl. 1) und wird von Alpha- und Gammaproteobakterien (Hanson & Hanson 1996) bzw. acidophilen Verrucomicrobia (Dunfield et al. 2007; Pol et al. 2007) katalysiert.

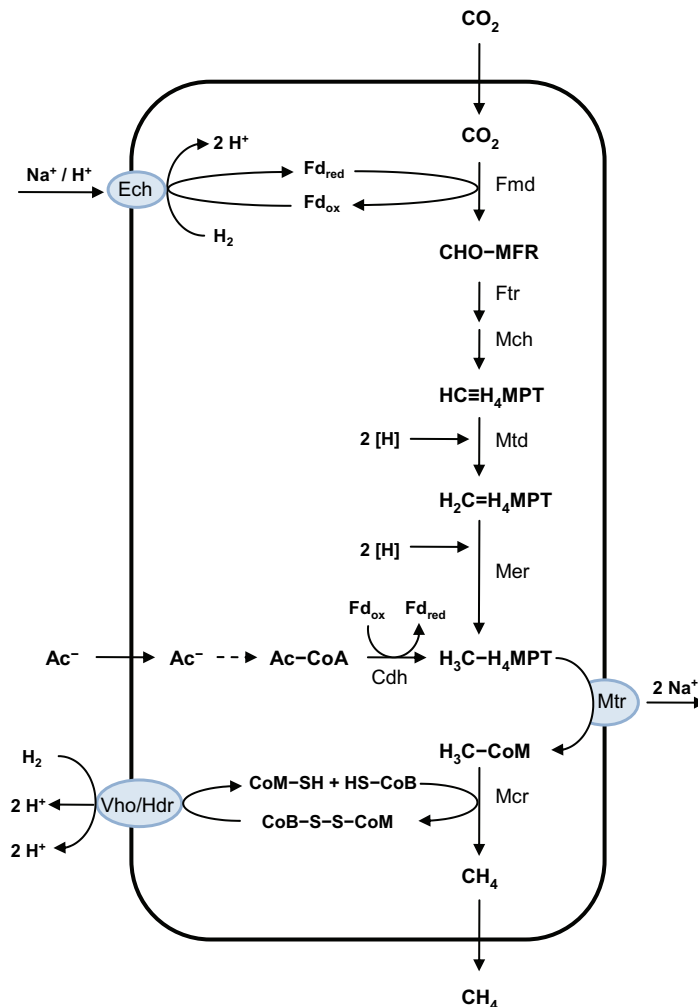


Die anaerobe Oxidation von Methan mit Sulfat als Elektronenakzeptor ist verantwortlich für die gegenüber der Produktion stark verringerten Emission von Methan aus den Ozeanen (Abb. 1), da sie etwa 300–380 Tg CH<sub>4</sub> pro Jahr zu CO<sub>2</sub> umsetzt (Hinrichs & Boetius 2002; Reeburgh 2007). Dies entspricht etwa 25% der globalen Methanproduktion. Unbekannt ist der Beitrag der anaeroben Oxidation von Methan mit Nitrit als Elektronenakzeptor (Ettwig et al. 2008; Raghoebarsing et al. 2006).

## 2. Methanogenese

Der größte Anteil des biogenen Methans wird von strikt anaeroben Archaeen produziert. Innerhalb der Euryarchaeota sind fünf Ordnungen methanogener Archaeen bekannt. *Methanobacteriales*, *Methanococcales*, *Methanomicrobiales* und die hyperthermophilen *Methanopyrales* nutzen hauptsächlich Wasserstoff als Elektronendonator für die

Methanbildung, zum Teil auch Formiat und Alkohole. Stoffwechselphysiologisch diverser sind *Methanosarcinales*, welche auch methylierte Verbindungen wie Methanol, Methylamine und Methylsulfide sowie Acetat zur Methanogenese verwerten. Diese können allerdings kein Formiat nutzen.

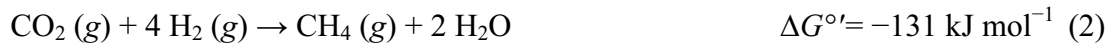


**Abbildung 2.** Schema der Reaktionen und Zwischenstufen in der Methanogenese aus Wasserstoff und Acetat bei *Methanosarcinales* (Methanogene mit Cytochromen). Energie konservierende Hydrogenase (Ech), Methanofuran (MFR), Formylmethanofuran-Dehydrogenase (Fmd), Formylmethanofuran:H<sub>4</sub>MPT-Methyltransferase (Ftr), Methenyl-H<sub>4</sub>MPT-Cyclohydrolase (Mch), F<sub>420</sub>-abhängige Methylene-H<sub>4</sub>MPT-Dehydrogenase (Mtd), F<sub>420</sub>-abhängige Methylene-H<sub>4</sub>MPT-Reduktase (Mer), H<sub>4</sub>MPT:Coenzym M-Methyltransferase (Mtr), Methyl-Coenzym M-Reduktase (Mcr), Heterodisulfid-Reduktase (Hdr), Viologen-abhängige Hydrogenase (Vho), Kohlenmonoxid-Dehydrogenase/Acetyl-CoA-Synthetase (Cdh). Modifiziert und vereinfacht nach Thauer et al. (2008) und Hedderich et al. (1999).

Bei der hydrogenotrophen Methanogenese (Gl. 2, Abb. 2) wird in einem Energie verbrauchenden Schritt zunächst CO<sub>2</sub> durch die Formylmethanofuran-Dehydrogenase an Methanofuran gebunden und reduziert (Thauer 1998). Anschließend wird die Formylgruppe auf ein Tetrahydromethanopterin (H<sub>4</sub>MPT) übertragen. In gebundener Form wird der

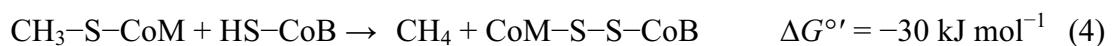


Kohlenstoff nun weiter bis zur Stufe der Methylgruppe reduziert. Methanogene besitzen verschiedene Hydrogenasen, von denen einige Cofaktor F<sub>420</sub> als Coenzym verwenden. Reduziertes F<sub>420</sub> ist der Elektronendonator für die Methylen-H<sub>4</sub>MPT-Dehydrogenase und die Methylen-H<sub>4</sub>MPT-Reduktase (Thauer 1998).



Die Methanogenese aus Acetat (Gl. 3, Abb. 2) verläuft über die Kohlenmonoxid-Dehydrogenase (Cdh). Zunächst wird in einem ATP-abhängigen Schritt Acetyl-Coenzym A gebildet. Die Methylgruppe des Acetats wird dann auf Tetrahydrosarcinapterin (H<sub>4</sub>SPT) übertragen, ein H<sub>4</sub>MPT-Derivat, das sich von H<sub>4</sub>MPT lediglich durch einen Glutamat-Rest in der Seitenkette unterscheidet (Thauer 1998). Die Carboxylgruppe wird zu CO<sub>2</sub> oxidiert.

Methyl-Coenzym M-Reduktase ist das Schlüsselenzym der Methanbildung. Methylgruppen aus allen methanogenen Stoffwechselwegen werden über Cobalamin-enthaltende Methyltransferasen (Ragsdale 2006) auf Coenzym M (CoM) übertragen. Die Methylgruppe von Methyl-H<sub>4</sub>MPT bzw. Methyl-H<sub>4</sub>SPT wird über eine membranständige Methyltransferase (Mtr) auf CoM übertragen und baut dabei einen Na<sup>+</sup>-Gradienten über die cytoplasmatische Membran auf (Thauer 1998). Das Mtr-Holoenzym besteht aus je zwei α, β und γ-Untereinheiten, die etwa eine Größe von 66, 48 und 37 kDa besitzen. In den zwei hydrophoben aktiven Zentren, die je einen Nickel-Cofaktor F<sub>430</sub> enthalten, werden Methan und ein Heterodisulfid (CoM-S-S-CoB) gebildet (Gl. 4). Dabei treibt vermutlich die Bindung von Methyl-Coenzym M und Coenzym B (CoB) im einen aktiven Zentrum die Freisetzung des Heterodisulfides aus dem zweiten Zentrum an („two-stroke engine“, Goenrich et al. 2005).

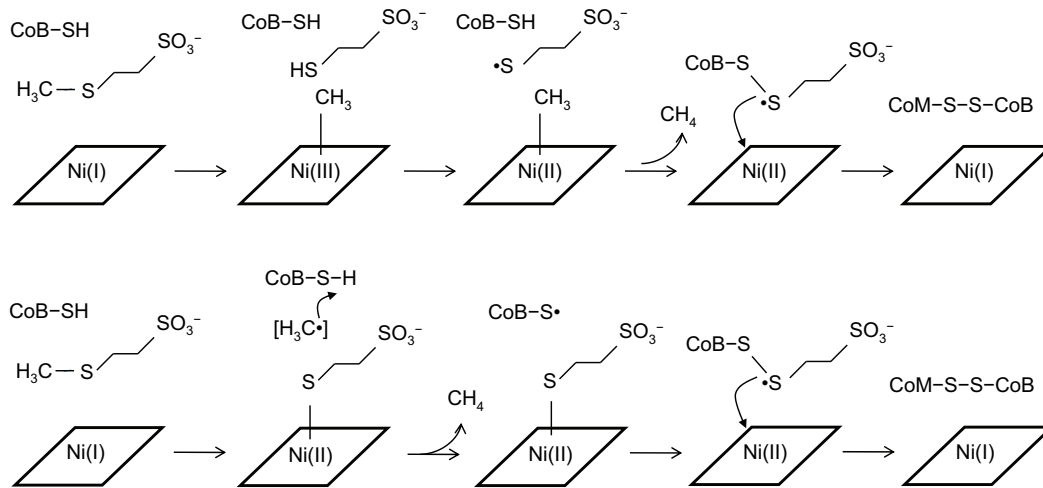


Hinsichtlich ihrer Energiekonservierung unterscheiden sich *Methanosarcinales* von den anderen methanogenen Archaeen. Erstere betreiben eine Heterodisulfid-Respiration über einen membranständigen Proteinkomplex aus einer Heterodisulfid-Reduktase (HdrDE) und einer Hydrogenase (VhoACG), in der ein Ionengradient über die Membran aufgebaut wird. Die Reduktionsäquivalente aus der Wasserstoffoxidation werden über Cytochrome vom *b*-Typ auf Methanophenazin übertragen, ein redox-aktives membranständiges Phenazin. Methanophenazin ist vermutlich der Elektronendonator für die Reduktion des

Heterodisulfides (Abken et al. 1998; Hedderich et al. 1999). Methanogene aus den anderen vier Ordnungen besitzen keine Cytochrome, kein Methanophenazin und eine lösliche Heterodisulfid-Reduktase (HdrABC); ihnen fehlt also eine Möglichkeit („coupling site“), Energie aus der Disulfidrespiration durch den Aufbau eines Ionengradienten über die Membran zu konservieren. Daher wurde vorgeschlagen, dass sie in einer Reaktion analog des Butyryl-CoA-Dehydrogenase/Etf-Komplexes von *Clostridium kluyveri* („Buckel-Thauer-Reaktion“ , Li et al. 2008) reduziertes Ferredoxin regenerieren, welches sie für die initiale Reduktion des CO<sub>2</sub> benötigen (Thauer et al. 2008).

### **Mechanismus der Methyl-Coenzym M-Reduktase**

Da es wahrscheinlich ist, dass die Methanaktivierung in der AOM über eine Mcr verläuft (Abschnitt A.1.5), sollen die verschiedenen Modelle zum Mechanismus der Methanbildung in der Mcr und ihrer potentiellen Reversibilität (Grabarse et al. 2001; Ragsdale 2006; Ragsdale 2007; Shima & Thauer 2005; Thauer & Shima 2008 und Referenzen darin) hier kurz vorgestellt werden (Abb. 3). In Mechanismus 1 attackiert das sehr nukleophile Ni(I) in einer S<sub>N</sub>2-Substitution das Methyl-Coenzym M, was zu einer Bildung eines Ni(III)-Methyl-Intermediates und Coenzym M führt. Methyl-Ni(III) hingegen ist sehr oxidativ und reagiert mit Coenzym M zum Coenzym M-Thiyl-Radikal und Methyl-Ni(II). Methyl-Ni(II) reagiert dann mit einem Proton des Coenzym B zu Ni(II) und Methan. Es bildet sich ein Disulfid-Anion-Radikal aus Coenzym M und Coenzym B, das zum Coenzym M-S-S-Coenzym B Heterodisulfid weiterreagiert und Ni(II) zu Ni(I) reduziert. Experimentelle Hinweise auf Mechanismus 1 sind die Reaktion von Ni(I) mit Methylbromid (Yang et al. 2007) und Methyljodid (Dey et al. 2007) zu Methyl-Ni(III) sowie der Nachweis von Alkyl-Nickel(III)-Intermediaten der Mcr bei Zugabe von Brompropansulfonat (Hinderberger et al. 2006; Kunz et al. 2006). Mechanismus 2 wurde vorgeschlagen von Pelmenschikov et al. (2002) und beruht auf Computerstudien zur Elektronendichte in der Mcr. Zunächst wird die C-S-Bindung des Methyl-Coenzym M homolytisch gespalten, wobei das Methyl-Radikal und ein Coenzym M-Thiyl-Radikal entsteht, das aber von Ni(I) zum Coenzym M-Anion reduziert wird. Der Nickel-Cofaktor erleichtert so das Aufbrechen der C-S-Bindung in Coenzym M. In einer Radikalreaktion des Methyl-Radikals mit Coenzym B entsteht dann Methan und das Coenzym B-Thiyl-Radikal, was dann mit dem Coenzym M-Anion zum Heterodisulfidanion-Radikal reagiert.



**Abbildung 3.** Mögliche Reaktionsmechanismen der Methyl-Coenzym M-Reduktase. In Mechanismus 1 entsteht ein Methyl-Ni (III)-Intermediat, während in Mechanismus 2 ein Coenzym M-Ni(III)-Intermediat und ein Methyl-Radikal entstehen. Modifiziert nach Shima & Thauer (2005) und Ragsdale (2007).

Aus der Sicht ihrer Reversibilität, also ihrer potentiellen Funktion in der Methanaktivierung, sind beide vorgeschlagenen Mechanismen problematisch. Ni(II) ist nicht elektrophil genug, um Methan nach Mechanismus 1 zu attackieren. Ein weiterer Kritikpunkt ist die geringere Bindungsenergie des Methyl-Ni(III) im Vergleich zur C-S-Bindung des methylierten Coenzym M. In Mechanismus 2 würde das Coenzym B-Thiyl-Radikal ein Wasserstoffatom vom Methan abstrahieren. Die Bindungsdissoziationsenergie der C-H-Bindung im Methan ( $\Delta G^{\circ'} = +439 \text{ kJ mol}^{-1}$ ) ist aber höher als die der S-H-Bindung im Coenzym B ( $\Delta G^{\circ'} = +365 \text{ kJ mol}^{-1}$ ), so dass das thermodynamische Gleichgewicht auf der Seite des Methans und nicht auf der des Methyl-Radikals liegt.

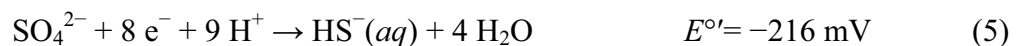
Eine Modifikation des Mechanismus 1 hingegen könnte die Methanaktivierung ermöglichen - das Methyl-Ni(III) reagiert mit einem Proton zu Methan und Ni(III) (Thauer & Shima 2008). Umgekehrt besitzt Ni(III) ein sehr hohes Redoxpotential und ist sehr elektrophil, es könnte daher einen elektrophilen Angriff auf das Methan katalysieren. Ein Mechanismus, der diese Reaktion beinhaltet, wurde vor kurzem von Duin und McKee (2008) vorgeschlagen, und beruht ebenfalls auf Berechnungen der Elektronendichte in der Mcr. Den ersten Schritt der Methanbildung bildet die Protonierung des F<sub>430</sub> am Nickel oder am Kohlenstoffskelett des Porphyrinringes. Im nächsten Schritt des Reaktionszyklus folgt eine oxidative Addition von Methyl-Coenzym M an Ni(I). Dann bewegt sich Ni(III) aus dem Porphyrinring heraus in Richtung des Coenzym B, was eine Interaktion der Schwefelatome von Coenzym M und Coenzym B ermöglicht. Nachdem das Heterodisulfid aus dem Enzym freigesetzt wird, kommt

es zur Bildung des Ni(III)-methyl-komplexes. Die Methylgruppe abstrahiert dann ein Proton vom Porphyrinring und Methan wird freigesetzt. Aus Sicht der Reversibilität würde Methan über ein Ni(III)-Hydrid aktiviert werden, denn Ni(III) reagiert mit Coenzym M formal gesehen zu einem Ni(III)-hydrid (Harmer et al. 2008), und Nickel-Hydride sind aus der anorganischen Chemie bekannt für Aktivierungen von Alkanen (Shilov & Shul'pin 1997).

Während der Reaktion der Mcr macht das Nickel einen zweifachen Valenzwechsel durch, von der stark reduzierenden Spezies  $F_{430}[\text{Ni(I)}]$  ( $E^{\circ'} = -600 \text{ mV}$ ) zu der sehr oxidierenden Spezies  $F_{430}[\text{Ni(III)}]$  ( $E^{\circ'} > +1\text{V}$ ). Beide Spezies sind sehr reaktiv, und erklären, warum die Reaktion in einem abgeschirmten, hydrophoben Zentrum stattfindet. Aufgrund des sehr negativen Redoxpotentials des  $F_{430}[\text{Ni(I)}]$ , das auch unter anoxischen Bedingungen langsam zu  $F_{430}[\text{Ni(II)}]$  oxidiert, könnte die Reversibilität der Mcr-Reaktion auf die anaerobe Oxidation von Methan mit Sulfat ( $\Delta E^{\circ'} \approx -250 \text{ mV}$ ) beschränkt sein, da die Respiration von Fe(III), Mn(IV) oder  $\text{NO}_3^-$  bei deutlich höherem Redoxpotential stattfindet.

### 3. Sulfatreduktion

Sulfat ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) ist mit einer Konzentration von 28 mM nach Chlorid das zweithäufigste Anion im Meerwasser und der wichtigste Elektronenakzeptor für die Oxidation organischen Kohlenstoffs in marinen Sedimenten (Jørgensen 1982). Die Konzentration von Sauerstoff beträgt nur etwa 300  $\mu\text{M}$ . Während dieser im Allgemeinen in den oberen Millimetern des Sedimentes bereits durch aerobe Atmungsprozesse aufgezehrt wird, dringt Sulfat auch in tiefere Schichten vor. Das Endprodukt der Sulfatreduktion ist Sulfid, das bei neutralen pH etwa zur Hälfte als  $\text{HS}^-$  und als  $\text{H}_2\text{S}$  vorliegt (Gl. 5).

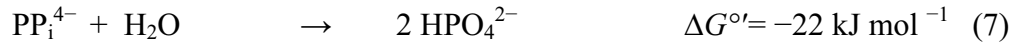
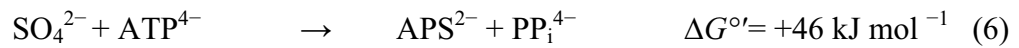


Dissimilatorisch sulfatreduzierende Prokaryoten (SRP) finden sich in fünf bakteriellen und zwei archaeellen Phyla. Die höchste Diversität besteht unter den Deltaproteobakterien, mit Vertretern aus mindestens 9 verschiedenen Familien und in den Gram-positiven Clostridia. Weiterhin können *Thermodesulfobacterium* sp. und *Thermodesulfatator indicus* (Thermodesulfobacteria), *Thermodesulfovibrio*-Arten (Nitrospira) sowie *Thermodesulfobium narugense* (Thermodesulfobiaceae) (Mori et al. 2003) Sulfat reduzieren. Innerhalb der Euryarchaeota ist dies nur von drei Arten der Gattung *Archaeoglobus* bekannt, von *Archaeoglobus fulgidus* (Stetter 1988), *Archaeoglobus profundus* (Burggraf et al. 1990) und *Archaeoglobus lithotrophicus* (Stetter et al. 1993). Zudem wird von der Sulfatreduktion durch die Crenarchaeota *Caldivirga marquilingensis* (Itoh et al. 1999) und *Thermocladium*

*modestius* (Itoh et al. 1998) berichtet, wobei genauere Daten dazu nicht präsentiert wurden. Mit der großen phylogenetischen Diversität der SRP geht auch eine metabolische Vielfalt einher (Rabus et al. 2006 und Referenzen darin). Die Verwendung von Wasserstoff als Elektronendonator ist weit verbreitet, jedoch sind einige hydrogenotrophe SRP nicht autotroph und benötigen zusätzlich eine organische Kohlenstoffquelle zum Wachstum. Fast alle Sulfatreduzierer sind organotroph und oxidieren z.B. organische Säuren und Alkohole, zum Teil jedoch nur unvollständig bis zum Acetat. In Sulfatreduzierern, die auch Acetat nutzen können („Komplettoxidierer“), geschieht dies entweder über einen modifizierten Citratcyclus oder über den Acetyl-CoA-Weg (Rabus et al. 2006). Substrate für spezialisierte Sulfatreduzierer sind unter anderem Fructose (Ollivier et al. 1988), Alkane (Aeckersberg et al. 1991; Aeckersberg et al. 1998; So & Young 1999), aromatische Kohlenwasserstoffe (Galushko et al. 1999; Harms et al. 1999a; Harms et al. 1999b; Rabus et al. 1993), Dimethylsulfoniumpropionat (van der Maarel et al. 1993), Methanthiol (Tanimoto & Bak 1994) oder Phosphit (Schink et al. 2002).

Trotz der phylogenetischen und physiologischen Diversität der sulfatreduzierenden Prokaryoten ist nur ein enzymatischer Weg der dissimilatorischen Sulfatreduktion bekannt, der von den Enzymen dissimilatorische ATP-Sulfurylase (Sat, E.C. 2.7.7.4), APS-Reduktase (Apr, E.C. 1.8.99.2) und Sulfitreduktase (Dsr, E.C. 1.8.99.1) katalysiert wird und die Intermediate Adenosin-5'-phosphosulfat (APS) und Sulfit involviert. Zur Sulfatassimilation nutzen die meisten Mikroorganismen Enzyme gleichen Namens, die die gleiche Nettoreaktion katalysieren. Die assimilatorischen Varianten der ATP-Sulfurylase, APS-Reduktase und Sulfitreduktase unterscheiden sich jedoch biochemisch und phylogenetisch von den dissimilatorischen (Fritz et al. 2002a; Gavel et al. 1998; Kopriva et al. 2008; Leyh & Suo 1992; Schiffer et al. 2008). Einige Mikroorganismen, z.B. *Escherichia coli*, beschreiten einen anderen Weg der Sulfatassimilation, in dem APS in einem weiteren Aktivierungsschritt durch die APS-Kinase zu Phospho-adenosin-5'-phosphosulfat (PAPS) phosphoryliert wird. Die anschließende Reduktion zu Sulfit erfolgt durch die PAPS-Reduktase.

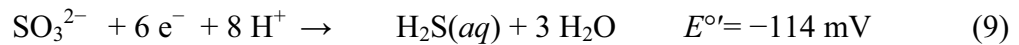
*Sulfataktivierung*



*Erster Reaktionsschritt*

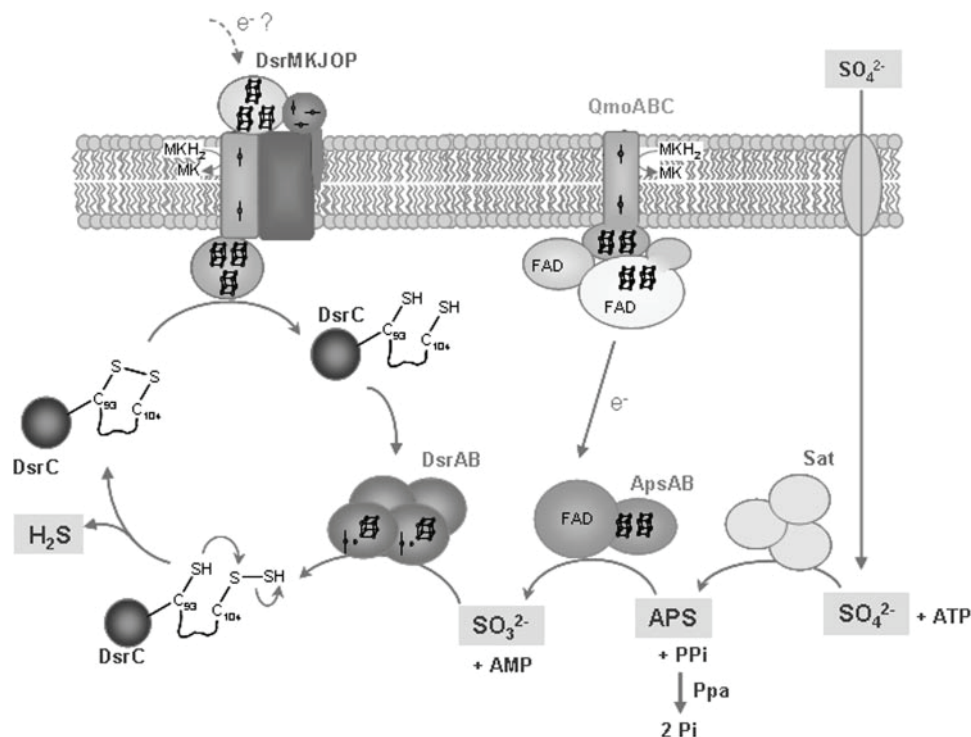


*Zweiter Reaktionsschritt*



Im ersten Schritt der dissimilatorischen Sulfatreduktion muss das unreaktive Sulfat-Anion für die folgende Reduktion aktiviert werden. Dies geschieht über eine Adenylierung zu APS, katalysiert von der ATP-Sulfurylase oder Sulfat-Adenylyltransferase (Sat), einem Cobalt- und Zink-haltigem Metalloenzym, das Homotrimere von 47–53 kDa bildet (Gavel et al. 1998; Sperling et al. 1998). Das neben APS als Reaktionsprodukt entstehende Pyrophosphat könnte durch eine Pyrophosphatase (Gl. 7) hydrolysiert werden, um das sehr ungünstige Gleichgewicht der endergonen Adenylierung von Sulfat etwas mehr auf die Seite der Produkte zu verlagern (Rabus et al. 2006). Das Redoxpaar APS/SO<sub>3</sub><sup>2-</sup> (E°' = -60 mV) besitzt ein gegenüber SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>/SO<sub>3</sub><sup>2-</sup> (E°' = -516 mV) deutlich erhöhtes Redoxpotential, was die Reduktion zu Sulfit begünstigt. Diese wird von der APS-Reduktase (Apr) katalysiert (Gl. 8), deren funktionelle Einheit ein αβ-Heterodimer von 90 kDa ist, wobei die etwa 70 kDa große α-Untereinheit das aktive Zentrum beherbergt (Fritz et al. 2000; Fritz et al. 2002b; Schiffer et al. 2006). Der Elektronendonator für die Apr ist wahrscheinlich der membranständige Qmo-Komplex, eine Menachinol:Apr-Oxidoreduktase (Haveman et al. 2004; Pires et al. 2003). Die Elektronen werden über zwei [4Fe-4S]-Zentren in der β-Untereinheit auf das FAD im aktiven Zentrum übertragen. Es bildet sich ein reduzierter FAD-APS-Komplex, aus dem Sulfit entlassen wird (Schiffer et al. 2006). Die Reduktion von Sulfit zu Sulfid (Gl. 9) wird von der dissimilatorischen Sulfitreduktase (Dsr) katalysiert. Der Elektronendonator für die Sulfitreduktion ist vermutlich der Transmembrankomplex DsrMKJOP (Abb. 4), der wiederum von Menachinol und möglicherweise einem unbekanntem Elektronendonator reduziert wird (Oliveira et al. 2008). Die Dsr besitzt eine α<sub>2</sub>β<sub>2</sub>-Struktur, mit einem Sirohäm-[4Fe-4S]-Cluster im katalytischen Zentrum, das seine Elektronen von einem weiteren peripheren [4Fe-4S]-Cluster erhält (Schiffer et al. 2008). Bei der Reinigung einiger Sulfitreduktasen wurde eine dritte, kovalent an DsrAB bindende Untereinheit (γ-Untereinheit, DsrC) gefunden (u.a.

Arendsen et al. 1993; Oliveira et al. 2008), so dass die funktionelle Einheit der Dsr in diesen Organismen ein  $\alpha_2\beta_2\gamma_2$ -Hexamer ist. DsrC besitzt eine redoxaktive Thiolgruppe und könnte so der cytoplasmatische Elektronenakzeptor für den DsrMKJOP-Komplex sein (Mander et al. 2005). Der Reaktionsmechanismus der Dsr ist noch nicht endgültig geklärt. Aufgrund der Strukturanalyse der Dsr ist es wahrscheinlich, dass Sulfid nicht in einer Sechs-Elektronen-Übertragung zu Sulfid reduziert wird, sondern in drei Schritten von jeweils zwei Elektronen, wobei freies Trithionat und Thiosulfat entgegen einer ursprünglichen Hypothese vermutlich nicht involviert sind. In einem neu vorgeschlagenen Mechanismus für die Sulfitreduktion kommt DsrC eine Schlüsselfunktion zu. Dabei fände zunächst eine Reduktion des Sulfites bis auf die Stufe von gebundenem elementarem Schwefel statt, worauf im entscheidenden Schritt die Bildung eines Persulfides am DsrC-Protein erfolgte, aus dem Sulfid entlassen würde (Oliveira et al. 2008).



**Abbildung 4.** Modell zum Mechanismus der Sulfatreduktion bei *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough (Oliveira et al. 2008). ATP-Sulfurylase (Sat), APS-Reduktase (Apr, hier ApsAB) und dissimilatorische Sulfitreduktase (Dsr) sind cytoplasmatische Proteine. Die Elektronen für die Sulfatreduktion entstammen hauptsächlich dem Menachinonpool der cytoplasmatischen Membran. QmoABC ist der vermutliche Elektronendonator für Apr. (ApsAB). Zwei der sechs Elektronen für die Sulfitreduktion werden über den DsrMKJOP-Komplex auf DsrC übertragen, welches vermutlich in den Elektronentransfer bei der Sulfitreduktion involviert ist. Der Ursprung der anderen vier Elektronen ist noch nicht bekannt.

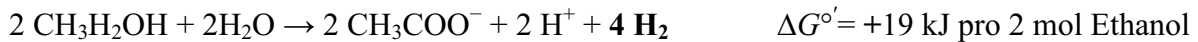
Die Gene *aprBA* und *dsrAB*, die für die beiden Schlüsselenzyme Apr und Dsr kodieren, werden als Marker für die Sulfatreduktion in Umweltproben eingesetzt. Phylogenetische Analysen dieser Gene zeigen eine hohe Übereinstimmung mit der Phylogenie der 16S rRNA, so dass mit ihnen auch eine Identifizierung von sulfatreduzierenden Mikroorganismen möglich ist. Andererseits offenbarten zur 16S rRNA-Phylogenie inkongruente Positionen in den AprBA- und DsrAB-Bäumen den horizontalen Gentransfer zwischen einzelnen Gruppen (Friedrich 2002; Wagner et al. 1998). So erhielten die *Archaeoglobus* spp. ihre Fähigkeit zur Sulfatreduktion vermutlich über einen Gentransfer von den gram-positiven SRB. Ein rezenter lateraler Gentransfer hat vermutlich von *Thermodesulfovibrio* zu *Thermacetogenium phaeum* stattgefunden (Meyer & Küver 2007).

#### 4. Syntrophie und extrazellulärer Elektronentransfer

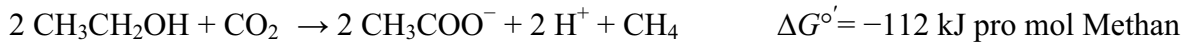
Methanogene und sulfatreduzierende Mikroorganismen sind häufig beteiligt an syntrophen Interaktionen. Als Syntrophie bezeichnet man die obligate wechselseitige Abhängigkeit zweier oder mehrerer Organismen beim Abbau eines Substrates (Schink 1997). Während aerobe Mikroorganismen organische Substanz meist verwerten können ohne auf Partner angewiesen zu sein, sind beim anaeroben Abbau verschiedene Stoffwechseltypen beteiligt (Schink 1997). Dabei werden zunächst Polymere (Polysaccharide, Lipide, Proteine und Nukleinsäuren) durch Fermentierer hydrolysiert, und die entstehenden Oligo- oder Monomere zu Wasserstoff, Formiat, Acetat sowie methylierten Verbindungen wie Trimethylamin, Methanol oder Methanthiol umgesetzt. Diese werden wiederum als Substrate für die Methanogenese genutzt. Zudem werden in der primären Gärung weitere Fettsäuren, Alkohole oder Aminosäuren gebildet, die Sulfatreduzierer, nicht aber Methanogene oxidieren können. Letztere sind auf sekundäre Gärer angewiesen, die bei der Disproportionierung dieser Substrate Acetat und Wasserstoff produzieren. Das älteste Beispiel solch einer syntrophen sekundären Gärung ist „*Methanobacillus omeliianski*“ (Bryant et al. 1967), eine Kokultur, die Ethanol und CO<sub>2</sub> zu Acetat und Methan umsetzt. Mit den Elektronen aus der Ethanoloxidation reduziert Stamm S Protonen zu Wasserstoff, der von Stamm M.o.H. als Elektronendonator verwendet wird („interspecies hydrogen transfer“). Diese sekundäre Gärung von Ethanol zu Acetat und Wasserstoff ist unter Standardbedingungen endergon ( $\Delta G^{\circ} > 0$ ), und bedarf daher obligat eines Methanogenen, der den Wasserstoffpartialdruck gering hält und damit die Reaktion ermöglicht ( $\Delta G' < 0$ ) (Schink & Stams 2006).



*Stamm S*



*Stamm M.o.H.*



Neben Ethanol, Butyrat und Propionat nutzen syntrophe Mikroorganismen auch Aceton, Aminosäuren, aromatische Kohlenwasserstoffe (Schink & Stams 2006 und Referenzen darin), Glycolat (Friedrich et al. 1991), Acetat (Zinder & Koch 1984) sowie langkettige Fettsäuren (Sousa et al. 2009). Auch aliphatische Kohlenwasserstoffe können unter methanogenen Bedingungen syntroph abgebaut werden (Zengler et al. 1999). Interessant ist das syntrophe Wachstum auf Formiat von *Moorella* sp. Stamm AMP oder *Desulfovibrio* sp. Stamm G11 in Kokultur mit Wasserstoff verwertenden Methanogenen (Dolfing et al. 2008), da die Standardredoxpotentiale der Paare Formiat/CO<sub>2</sub> ( $E^{\circ'} = -420 \text{ mV}$ ) und H<sub>2</sub>/2H<sup>+</sup> ( $E^{\circ'} = -414 \text{ mV}$ ) sehr nahe zusammen liegen und daher eine intermediäre Bildung von Wasserstoff mit Formiat unter Standardbedingungen kaum exergon ist.

Die meisten Arten sekundärer Gärer finden sich innerhalb der Deltaproteobacteria in den Genera *Desulfoglaeba*, *Desulfovibrio*, *Geobacter*, *Syntrophus*, *Syntrophobacter* und *Pelobacter* sowie in zwei Gruppen der (low-GC) Gram-positiven Bakterien, einerseits in der Familie Syntrophomonadaceae und andererseits in den Genera *Desulfotomaculum*, *Pelotomaculum*, *Sporotomaculum*, und *Syntrophobotulus* (McInerney et al. 2008).

Syntrophe Interaktionen existieren nicht ausschließlich unter methanogenen Bedingungen (Stams et al. 2006). Auch Sulfat reduzierende Bakterien (SRB) und Homoacetogene (Zindel et al. 1988) können als syntrophe Partner Wasserstoff oder Formiat oxidieren. In der acetoclastischen und der methylotrophen Methanogenese wird Wasserstoff freigesetzt, von dem Sulfatreduzierer profitieren (Finke et al. 2007; Phelps et al. 1985).

### **Extrazellulärer Elektronentransfer zwischen Mikroorganismen**

Syntrophe Interaktionen bedingen immer einen Transfer von Reduktionsäquivalenten (oder extrazellulären Elektronentransfer) von einem Organismus zum anderen. Neben dem klassischen Wasserstofftransfer wird oftmals Formiat übertragen. Die intrazellulären Elektronendonatoren für Hydrogenase und Formiat-Dehydrogenase sind vermutlich sehr

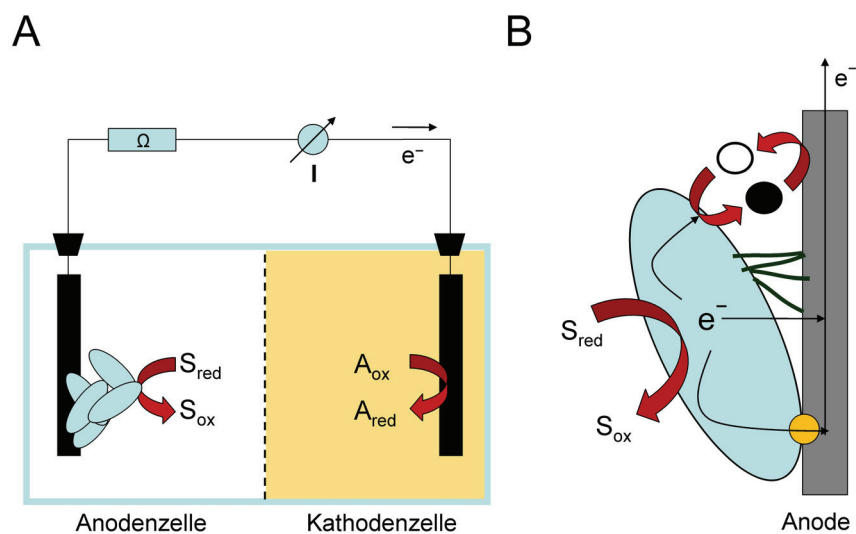
ähnlich, so dass Syntrophe oft Wasserstoff und Formiat parallel als Elektronenüberträger verwenden können (Schink & Stams 2006). Acetat kann man ebenfalls als Elektronenüberträger betrachten, da es in der anaeroben Nahrungskette, aber auch in definierten Kokulturen letztlich von acetoclastischen Methanogenen oder Sulfatreduzierern (Warikoo et al. 1996) genutzt wird. Zudem wurde eine Hemmung der sekundären Gärung durch Acetat beobachtet (u.a. Ahring & Westermann 1988; Dolfing & Tiedje 1988). In phototrophen Konsortien werden Elektronen aus der Oxidation organischer Substanz von *Desulfuromonas acetoxidans* über Sulfid zu *Chlorochromatium* transferiert (Pfennig & Biebl 1976). Der unidirektionale Transfer von Elektronen bedingt dabei einen bidirektionalen Stofftransfer, da elementarer Schwefel zurück zum Schwefelreduzierer transferiert wird. Man betrachtet daher Sulfid/Schwefel als Elektronenüberträger („electron shuttle“). Der Elektronentransfer von *Desulfuromonas acetoxidans* zu *Wollinella succinogenes*, der Nitrat reduziert, beruht ebenfalls auf dem Überträgersystem Sulfid/Schwefel, kann aber auch über Cystein/Cystin verlaufen (Kaden et al. 2002).

### **Mechanismen des extrazellulären Elektronentransfers zu Oberflächen**

Extrazelluläre Elektronenübertragung im direkten Zell-Oberflächenkontakt wurde besonders bei der Reduktion unlöslicher Metalloxide, z.B.  $\text{Fe}(\text{OH})_3$ , und bei der Übertragung von Elektronen auf Elektroden in elektrochemischen Zellen bzw. mikrobiellen Brennstoffzellen („microbial fuel cell“, MFC) (Abb. 5) untersucht. Die Möglichkeit der Stromgewinnung aus solchen bakteriellen Batterien ist seit Beginn des 20. Jahrhunderts bekannt (Lewis 1966). Dabei oxidieren Misch- oder Reinkulturen von Bakterien (meist) organische Substrate, und die Elektronen werden auf die Anode übertragen. Stromproduktion in MFCs konnte für Arten aus allen fünf Klassen der Proteobacteria, für Firmicutes und Acidobacteria sowie für die Hefe *Pichia anomalia* gezeigt werden (Logan 2009; Rabaey et al. 2007). Mikroorganismen können Elektroden auch als Elektronendonatoren nutzen. So reduzierten Mischkulturen (Clauwaert et al. 2007; Gregory et al. 2004) sowie *Geobacter metallireducens* Nitrat und *G. sulfurreducens* Fumarat an der Kathode (Clauwaert et al. 2007; Gregory et al. 2004). Zudem ist die Elektroden-gekoppelte Reduktion von Sauerstoff (Bergel et al. 2005), Uran (VI) (Gregory & Lovley 2005), Perchlorat (in Gegenwart von AQDS) (Thrash et al. 2007) und 1,2-Dichloroethan (Pham et al. 2009) gezeigt worden.

Umfassende Studien der Mechanismen des extrazellulären Elektronentransfers zu Oberflächen wurden besonders mit *G. sulfurreducens* und *Shewanella oneidensis* durchgeführt. Beide Organismen reduzieren unlösliche Fe(III)-Oxide und können auch

Elektronen auf Elektroden übertragen. Während *Shewanella* spp. Eisenreduktion auch ohne direkten Kontakt katalysiert, benötigt *Geobacter* spp. den Zusatz eines Mediators oder den direkten Oberflächenkontakt (Richter et al. 2009). Drei Mechanismen des extrazellulären Elektronentransfer lassen sich unterscheiden (Abb. 5B), der direkte Transfer über Zell-Oberflächen-Kontakt, der Transfer über leitende Pili (Nanodrähte) und der über Mediatoren vermittelte Elektronentransfer, ähnlich dem syntrophen extrazellulären Elektronentransfer über Intermediate.



**Abbildung 5.** (A) Prinzip einer mikrobiellen Brennstoffzelle. Mikroorganismen oxidieren ein Substrat S und übertragen die Elektronen auf die Anode. Als Anode wird in mikrobiellen Brennstoffzellen der äußere Minuspol bezeichnet. An der Kathode wird ein Elektronenakzeptor A reduziert. (B) Mechanismen der Elektrodenreduktion. Die Reduktionsäquivalente aus der Substratoxidation können über redoxaktive Mediatoren (oben), leitende Pili (Nanodrähte) (Mitte) oder im direkten Zell-Elektrodenkontakt über redoxaktive Proteine in der äußeren Zellmembran (unten) auf die Anode übertragen werden.

Beim direkten Elektronentransfer bilden die Zellen direkten Kontakt zur Elektrodenoberfläche aus. Die Elektronen aus der Atmungskette werden dann über Proteine in der äußeren Zellmembran auf die Elektrode übertragen. Eine Hauptfunktion kommt hierbei einer Vielzahl von Cytochromen („outer membrane cytochromes“, Omc) zu. *G. sulfurreducens* transferiert hierbei möglicherweise die Elektronen aus der Substratoxidation über eine Kette von Cytochromen auf OmcB und OmcS, die wichtig für den Elektronentransfer zur Elektrode sind (Lovley 2008).

Kontrovers diskutiert wird der extrazelluläre Elektronentransfer über „Nanowires“, leitende Typ IV-Pili, die erstmals für *G. sulfurreducens* beschrieben wurden (Reguera et al. 2005). Sie sind essentiell für die Stromproduktion, wenn die Zellen dicke Biofilme auf der

Anode bilden (Reguera et al. 2006). Für ihre Leitfähigkeit scheinen wiederum Cytochrome verantwortlich zu sein, die sich auf der Oberfläche der Pili befinden (Richter et al. 2009). *S. oneidensis* MR-1 bildet bis zu 50 nm dicke, mehrere µm lange dicke Bündel von Pili, die die Cytochrome MtrC und OmcA auf der Oberfläche tragen. Die Pili werden besonders bei Mangel an externen Elektronenakzeptoren synthetisiert, und es gibt Hinweise auf die Leitfähigkeit der Pili entlang ihrer Längsachse (El-Naggar et al. 2008). Die Fähigkeit der Produktion leitender Pili ist nicht beschränkt auf Metall-reduzierende Mikroorganismen, sondern wurde auch bei dem Cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 sowie bei *Pelotomaculum thermopropionicum* gefunden, unter anderem in einer Kokultur mit *Methanothermobacter thermautotrophicus* (Gorby et al. 2006). Möglicherweise können leitende Pili also auch Elektronentransfer zwischen Organismen vermitteln.

Extrazelluläre Elektronenübertragung kann auch über Mediatoren stattfinden. Mediatoren sind redoxaktive Überträger von Reduktionsäquivalenten zwischen verschiedenen Mikroorganismen („interspecies electron transfer“) sowie zwischen Mikroorganismen und Elektronenakzeptoren in fester Form. So wird die Reduktion von Fe(III)-Oxiden durch verschiedene Eisen reduzierende Bakterien über Huminstoffe und Anthrachinon-2,6-disulfonat (AQDS) verstärkt oder erst induziert (Nevin & Lovley 2000; Straub & Schink 2003). Mediatoren wie Kaliumhexacyanoferrat (Emde et al. 1989) oder Neutralrot (Park & Zeikus 2000) wurden zunächst in MFCs eingesetzt, um die Stromproduktion zu induzieren. Zunehmend werden auch endogene Redoxmediatoren gefunden, die von den Mikroorganismen im Sekundärstoffwechsel synthetisiert wurden. So reduziert *Shewanella putrefaciens* Fe(III) über ein ins Medium abgegebenes Menachinon (Newman & Kolter 2000). Andere *Shewanella* spp. scheiden Flavine aus (von Canstein et al. 2008). *Pseudomonas chloroaphis* produziert Phenazine-1-carboxamid (Hernandez et al. 2004). Pyocyanin, ein weiteres Phenazin, wurde als Redoxmediator in einer MFC mit *P. aeruginosa* nachgewiesen (Rabaey et al. 2005). Als Mediator-vermittelten Elektronentransfer zur Anode könnte man auch die fermentative Produktion von Wasserstoff (Niessen et al. 2005) sowie die Produktion von Sulfid durch Schwefelreduzierer (Dutta et al. 2009) betrachten, bei der Wasserstoff bzw. Schwefel an der Elektrode oxidiert werden.

## 5. Anaerobe Oxidation von Methan (AOM)

Erste Hinweise auf eine anaerobe Oxidation von Methan mit Sulfat als Elektronenakzeptor lieferten Profile aus marinen Sedimenten, die eine Zone offenbarten, in der eine gleichzeitige Abnahme von Methan und Sulfat stattfindet (Barnes & Goldberg 1976; Martens & Berner 1977; Reeburgh 1976). Daher wurde eine Kopplung von Methanoxidation und Sulfatreduktion vorgeschlagen (Gl. 10).



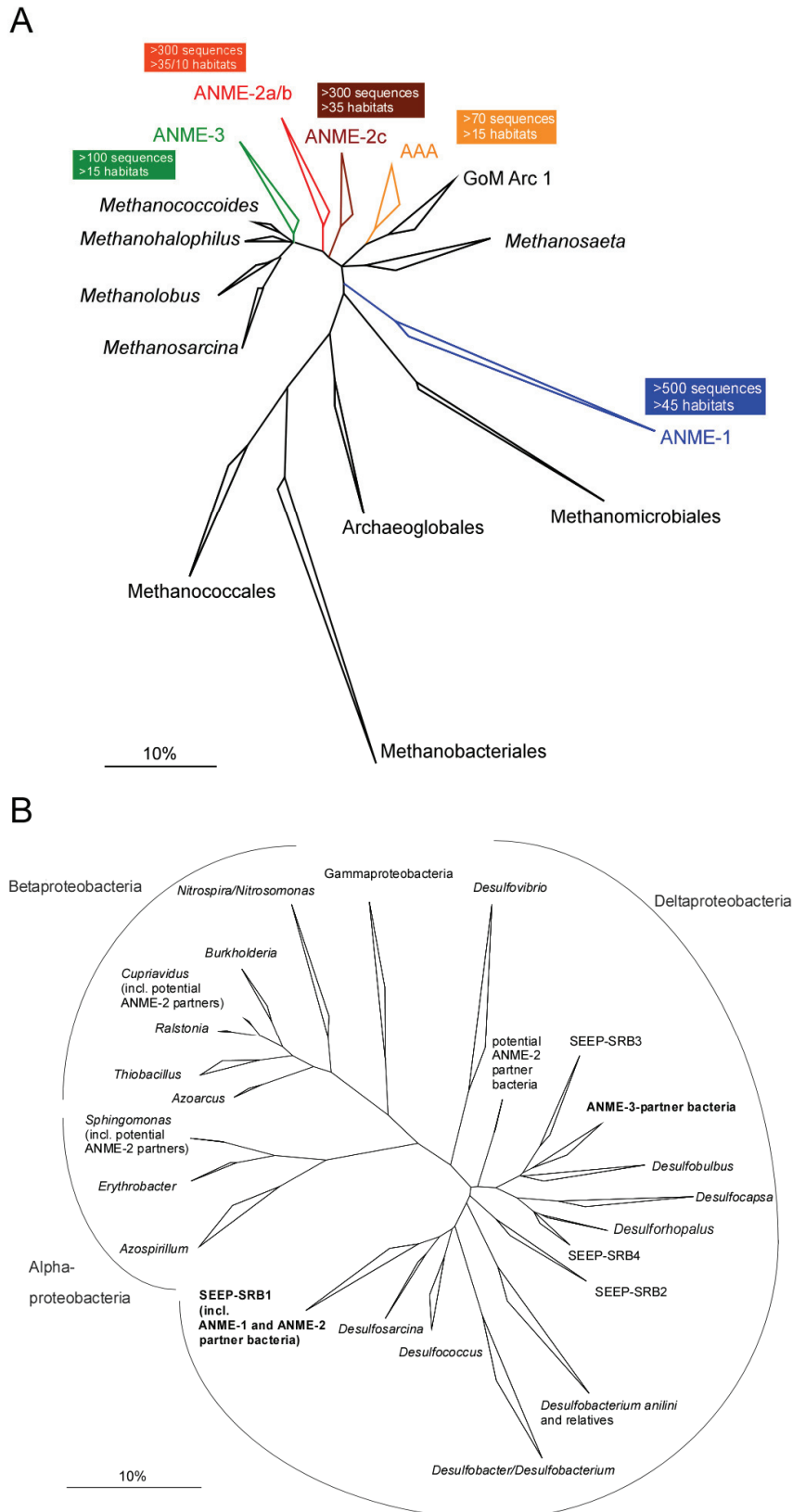
In Experimenten mit den radioaktiven Isotopen  $^{14}\text{CH}_4$  und  $^{35}\text{SO}_4^{2-}$  wurde die Existenz einer Methanoxidation unter anoxischen Bedingungen in der Sulfat-Methan-Übergangszone (SMTZ) belegt (Reeburgh 1980), und die Sulfatreduktion wies ein distinktes Maximum der Zone der Methanoxidation auf (Devol 1983; Iversen & Jørgensen 1985). Es wurde zunächst vermutet, dass Methanogene für die Methanoxidation verantwortlich sein könnten. Zehnder und Brock beobachteten, dass Reinkulturen von Methanogenen während der Methanogenese zu einem geringem Prozentsatz auch  $^{14}\text{CH}_4$  zu  $^{14}\text{CO}_2$  oxidierten, und schlugen vor, dass Methanogene zusammen mit einem syntrophen Partner, z.B. einem Sulfatreduzierer, AOM katalysieren (Zehnder & Brock 1979). Hoehler et al. (1994) beobachteten, dass die Methanoxidation in marinem Sediment durch Bromoethansulfonat (BES), einem spezifischen Inhibitor für die Methanogenese, gehemmt und durch die Zugabe von Sulfat stimuliert wurde, und schlugen daher ebenfalls vor, dass AOM durch syntrophe Konsortien aus methanogenen Archaeen und sulfatreduzierenden Bakterien durchgeführt wird. Der Nachweis, dass anaerob lebende Archaeen Methan als Kohlenstoffquelle nutzen, erfolgte über archaeelle Tetraetherlipide, Archaeol und sn-2-Hydroxyarchaeol, die aus den anoxischen Sedimenten des Eel River Basin extrahiert wurden. Genau wie das isotopisch leichte Methan aus den Gashydraten dort wiesen die Lipide eine sehr geringe  $\delta^{13}\text{C}$ -Signatur auf. Eine parallele Analyse der archaeellen 16S rRNA Gene aus dem gleichen Sediment bewies die Dominanz von bisher unbekanntem, mit den Methanogenen verwandten Organismen, die vermutlich für die Methanoxidation verantwortlich waren und daher anaerobe methanotrophe Archaeen (ANME) genannt wurden (Hinrichs et al. 1999). Der visuelle Nachweis der AOM katalysierenden Organismen wurde über spezifische, an die ribosomale RNA bindende Nukleotidsonden (Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung, FISH) erbracht (Boetius et al. 2000b). Sedimentschichten vom Hydratrücken, die hohe AOM-Raten aufwiesen, enthielten hauptsächlich Konsortien von ANME-Zellen und Bakterien aus der

*Desulfosarcina/Desulfococcus*-Gruppe (DSS), die verwandt zu bekannten sulfatreduzierenden Bakterien waren. FISH in Kombination mit Sekundärionen-Massenspektrometrie (SIMS) erbrachte dann den direkten Nachweis der Inkorporation von isotopisch leichtem Methan in die archaeellen Zellen eines ANME/SRB-Konsortiums (Orphan et al. 2001b).

Anaerobe Oxidation von Methan gekoppelt an die Reduktion von Sulfat konnte inzwischen in vielen marinen Sedimenten in der SMTZ nachgewiesen werden (Knittel & Boetius 2009) und wurde auch von sulfatreichen limnischen Sedimenten (Alain et al. 2006; Eller et al. 2005) und terrestrischen Schlammvulkanen (Alain et al. 2006; Eller et al. 2005) berichtet. Die höchsten AOM-Raten wurden an Methan-gesättigten marinen Standorten beobachtet: in Sedimenten von Schlammvulkanen und oberhalb von Gashydraten, sowie in den „mikrobiellen Riffen“ des Schwarzen Meeres (Knittel & Boetius 2009).

### **Beteiligte Organismen**

Die anaeroben methanotrophen Archaeen werden in drei distinkte Gruppen unterteilt. ANME-1 ist entfernt verwandt mit Methanogenen der Ordnungen *Methanomicrobiales* und *Methanosarcinales*, während ANME-2 und ANME-3 zu den *Methanosarcinales* gehören. Innerhalb der ANME-2 Gruppe werden drei Untergruppen (a,b,c) unterschieden (Abb. 6). Die assoziierten Bakterien bilden ebenfalls distinkte phylogenetische Gruppen. ANME-1 und ANME-2 bilden Aggregate mit Bakterien aus der *Desulfosarcina/Desulfococcus*-Gruppe (DSS; Knittel & Boetius 2009). Die rosafarbenen mikrobiellen Matten aus dem schwarzen Meer werden größtenteils von ANME-1 und DSS gebildet. Konsortien aus ANME-2 und DSS dominieren Standorte, an denen der Methan-Flux und die AOM-Raten besonders hoch sind (Knittel & Boetius 2009). Während üblicherweise DSS die ANME-2c-Zellen schalenförmig umgeben („shell-type consortia“; Boetius et al. 2000b), bilden ANME-2a und DSS stärker gemischte Konsortien („mixed type consortia“). Zusätzlich wurde auch von einzelnen Konsortien von ANME-2c mit assoziierten Alpha- und Betaproteobakterien berichtet (Abb. 6B; Pernthaler et al. 2008). ANME-3 ist häufig mit Desulfobulbaceae assoziiert. Allerdings wurden auch ANME-3-Aggregate ohne assoziierte Bakterien gefunden (Lösekann et al. 2007; Omoregie et al. 2008). Einzelzellen und Aggregate von ANME-1 und ANME-2 wurden ebenfalls ohne bakterielle Partner beobachtet (Knittel et al. 2005; Orcutt et al. 2005; Orphan et al. 2002; Treude et al. 2007). Das Wachstum und die Anreicherung von ANME-2/SRB-Konsortien konnte *in vitro* gezeigt werden (Girguis et al. 2005; Girguis et al. 2003; Holler et al. 2009; Meulepas et al. 2009; Nauhaus et al. 2007). Reinkulturen oder Kulturen, die ausschließlich aus ANME/SRB-Konsortien bestehen, existieren noch nicht.



**Abbildung 6.** Phylogenetische Stammbäume des 16S rRNA Gens, die (A) die Verwandtschaft der ANME mit den methanogenen Archaeen sowie (B) die Position der ANME-assoziierten Bakterien innerhalb der Proteobakterien darstellen. Der Balken entspricht 10 % Sequenzabweichung. Die Bäume wurden von Katrin Knittel zur Verfügung gestellt.

## Physiologie und Biochemie der anaeroben Oxidation von Methan

Eines der interessantesten Probleme der AOM besteht in der initialen Aktivierung des Methans. Methan besitzt vier gleich starke C–H-Bindungen mit einer hohen Dissoziationsenergie von  $\Delta G^{\circ'} = +439 \text{ kJ mol}^{-1}$  und ist daher ein schwer anzugreifendes Molekül. Aerobe Mikroorganismen polarisieren die C–H-Bindung über die Oxygenierung durch Eisen-abhängige Methan-Monooxygenasen (Ragsdale 2006). Anaerobe Mikroorganismen müssen hingegen sauerstoffunabhängige Mechanismen entwickelt haben, um die C–H Bindung des Methans für den Abbau zu aktivieren. Eine Möglichkeit dazu ist die Fumarataddition, die bei der Aktivierung höherer Alkane und von Alkylbenzolen gefunden wurde. Dabei wird über Enzymzentren, die ein Radikal tragen, ein Wasserstoffatom vom Kohlenwasserstoff abstrahiert, so dass anschließend Fumarat mit dem Alkylradikal zu Alkylsuccinaten reagiert (Grundmann et al. 2008; Heider 2007; Kniemeyer et al. 2007). Eine Aktivierung des Methans über die Addition an Fumarat konnte noch nicht gezeigt werden. In der Methanoxidation mit Sulfat erscheint dieser Mechanismus thermodynamisch schwierig, da die Reaktion von Methan und Fumarat zu 2-Methylsuccinat eine freie Energie der Bildung von  $\Delta G^{\circ'} = -10$  bis  $-20 \text{ kJ mol}^{-1}$  besitzt, die im Bereich der Bildungsenergie der Gesamtreaktion der Methanoxidation mit Sulfat liegt. Da die Addition an Fumarat eine Radikalreaktion einschließt, könnte die Energie aus der AOM nicht konserviert werden (Thauer & Shima 2008).

Die Aktivierung des Methans in der AOM mit Sulfat als Elektronenakzeptor ist vermutlich eine Umkehrung des letzten Schrittes der Methanbildung durch das Enzym Methyl-Coenzym M-Reduktase (Mcr) (Abschnitt A.2.). Ein erster Hinweis darauf war die Entdeckung bisher unbekannter *mcrA*-Sequenzen, die ANME-1 und ANME-2 Archaeen zugeordnet werden konnten (Hallam et al. 2003). Wichtige Hinweise auf eine Beteiligung der Mcr an der Methanoxidation lieferten biochemische Untersuchungen von mikrobiellen Matten aus dem Schwarzen Meer. Die Matten entstammten den dortigen „mikrobiellen Riffen“ (Michaelis et al. 2002), waren dominiert von Aggregaten aus ANME und SRB (Blumenberg et al. 2004; Reitner et al. 2005a) und zeigten mit die höchsten festgestellten AOM-Raten (Knittel & Boetius 2009). Die Matten enthielten große Mengen eines Mcr-ähnlichen Nickelproteines (Nickelprotein I). Dies legte eine Funktion in der AOM nahe. Aus den pinken, ANME-1-dominierten Matten aus den Zentren der Carbonatstrukturen der mikrobiellen Riffe wurde Nickelprotein I extrahiert, das bis zu 7% des Gesamtproteins der Matte ausmacht. Der Cofaktor  $F_{430}$  des Nickelprotein I besitzt eine Masse von 951 Da (Krüger

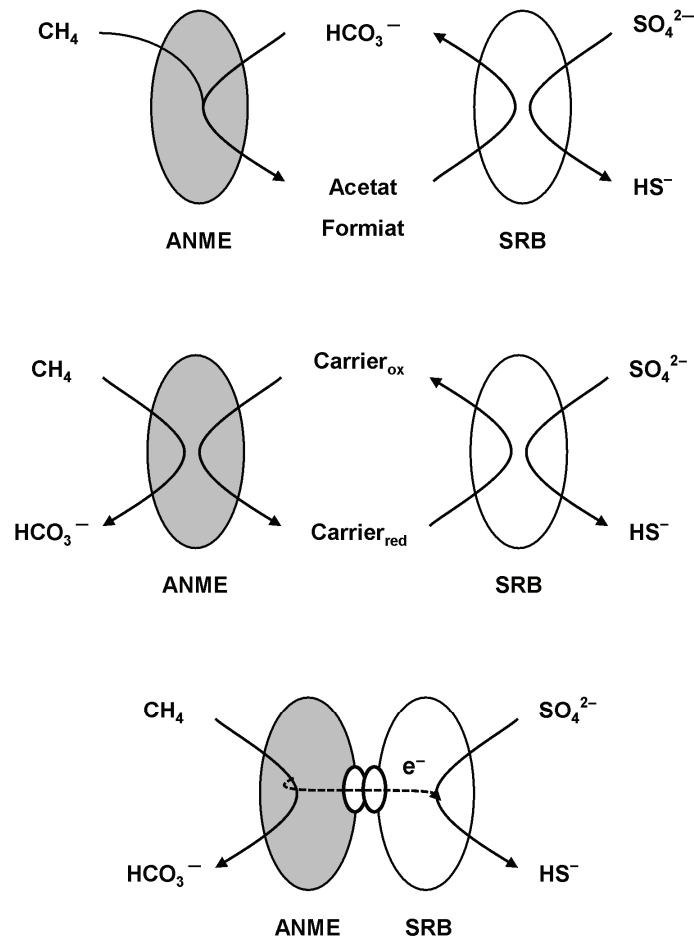


et al. 2003) und trägt als Modifikation eine zusätzliche Methylthiogruppe (Mayr et al. 2008). Es wurde vorgeschlagen, dass diese Modifikation eine Anpassung der Mcr an die Methanoxidation darstellt. Die aktiveren, schwarzen, ANME-2-dominierten mikrobiellen Matten hingegen, die an der Oberfläche der Carbonatstrukturen wachsen, enthalten vornehmlich Nickelprotein II, das einen nicht modifizierten Cofaktor F<sub>430</sub> mit einer Masse von 905 Da (Krüger, Shima, Kahnt, Thauer, unpublizierte Ergebnisse) enthält. Eine Studie mit Gold-markierten, gegen die Mcr gerichteten Antikörpern zeigte die Expression von Mcr in ANME-1- und ANME-2-Zellen (Heller et al. 2008).

Wenig ist über den weiteren Stoffwechselweg der AOM bekannt. Es wurde vorgeschlagen, dass ANME Methan komplett bis zum CO<sub>2</sub> oxidieren. Im Prinzip ist der Stoffwechselweg der hydrogenotrophen Methanogenese reversibel, denn Reinkulturen methanogener Archaeen oxidieren unter methanogenen Bedingungen auch geringe Menge Methan (Harder 1997; Zehnder & Brock 1979). Eine Netto-Methanoxidation von Methanogenen, auch bei geringen Wasserstoffpartialdrücken, konnte aber nicht gezeigt werden (Valentine et al. 2000). Dies zeigt, dass Methanogene nicht prinzipiell substantielle Mengen Methan oxidieren können, und dass die Methanoxidation eine Rückreaktion der Methanogenese darstellt. Auf der anderen Seite geht die Methanogenese in mikrobiellen Matten aus dem Schwarzen Meer (Treude et al. 2007) sowie in AOM-Anreicherungskulturen (T.Holler, pers. Mitt.) wahrscheinlich ebenfalls auf die Rückreaktion der AOM zurück, da sie maximal 10% der Methanogenese ausmacht, nur unter AOM Bedingungen stattfindet, und keine Netto-Methanogenese darstellt. Metagenomische Untersuchungen zeigten, dass die Genome von ANME-1 und ANME-2c fast alle Gene für die Proteine des methanogenen Stoffwechsels enthalten (Hallam et al. 2004; Pernthaler et al. 2008). ANME-1 und ANME-2c besitzen also zumindest das genetische Potential für eine „reverse Methanogenese“. In der Untersuchung von Hallam et al. (2004) konnte das Gen für die F<sub>420</sub>-abhängige Methylen-H<sub>4</sub>MPT-Reduktase (Mer) nicht den ANME zugeordnet werden. Allerdings existiert ein Mer-unabhängiger Stoffwechselweg in *Methanosarcina barkeri* (Welanders & Metcalf 2008).

AOM ist in marinen Sedimenten gekoppelt an die Sulfatreduktion, und *in vitro* betrug das Verhältnis von Methanoxidation zu Sulfatreduktion 1:1 (Nauhaus et al. 2002). Sulfat ist jedoch nicht der einzige Elektronenakzeptor für die anaerobe Oxidation von Methan. Die Oxidation von Methan mit Nitrit als Elektronenakzeptor wurde für eine Anreicherungskultur aus einem Süßwasser-Sediment gezeigt (Raghoebarsing et al. 2006). Der Prozess wird unter anoxischen Bedingungen von Bakterien aus dem NC-10-Phylum (Ettwig et al. 2008) katalysiert und verläuft vermutlich über einen von der Mcr unabhängigen Stoffwechselweg. In

einer neuen Studie wurde von einer Methanoxidation mit Eisen und Mangan als Elektronenakzeptor in einem marinen Sediment berichtet (Beal et al. 2009). Die Kopplung von Methanoxidation und Metallreduktion wurde in dieser Studie jedoch nicht gezeigt.



**Abbildung 7.** Potentielle Mechanismen der extrazellulären Übertragung von Reduktionsäquivalenten in einer Syntrophie zwischen ANME und den assoziierten SRB. Oben: Reduziertes Kohlenstoffintermediat, möglicherweise aus dem Kohlenstoff des Methans abgeleitet. Mitte: Extrazellulärer Transfer von Elektronen mittels Überträgermoleküle („carrier“). Unten: direkter Transfer über Zell-Zell-Kontakt oder über Nanodrähte.

In der AOM mit Sulfat als Elektronenakzeptor könnten SRB in einer syntrophen Interaktion mit den Archaeen die Sulfatreduktion durchführen (Hoehler et al. 1994; Zehnder & Brock 1979). In diesem Fall müsste ein extrazellulärer Elektronentransfer von ANME zu den assoziierten SRB stattfinden, wofür prinzipiell mehrere Möglichkeiten existieren (Abb. 7). Einerseits könnte eine reduzierte Kohlenstoffverbindung das Endprodukt der Methanoxidation und der Elektronendonator für die SRB sein. Dazu würden ANME entweder Methan nur unvollständig oxidieren und ein Intermediat aus der Methanoxidation freisetzen, oder die Elektronen aus einer vollständigen Methanoxidation auf  $\text{CO}_2$  übertragen. Eine zweite

Möglichkeit ist der Elektronentransfer über Elektronenüberträger („electron carrier“) wie AH<sub>2</sub>QDS/AQDS oder H<sub>2</sub>S/S<sup>0</sup>, die in der oxidierten Form Elektronenakzeptor für die Methanoxidation und in der reduzierten Form Elektronendonator für die Sulfatreduktion sind. Nicht auszuschließen ist die Möglichkeit eines direkten Elektronentransfers im Zell-Zell-Kontakt oder über Nanodrähte, obgleich ein solcher Elektronentransfer zwischen Zellen noch nicht nachgewiesen ist. Analog zu den methanogenen Syntrophien wurden zunächst Wasserstoff, Acetat oder Formiat als übertragene Intermediate angenommen (Boetius et al. 2000b; Hoehler et al. 1994; Valentine 2002). Experimentell bewirkten weder diese Verbindungen noch Methanol in Abwesenheit von Methan eine Sulfatreduktion, die der mit Methan als Elektronendonator vergleichbar gewesen wäre (Nauhaus et al. 2002). Moran et al. (2008) schlugen Methanthiol als transferiertes Intermediat vor, der Effekt auf die Sulfatreduktion wurde aber nicht geprüft. Weiterhin konnte nicht gezeigt werden, dass diverse Elektronenüberträger wie AQDS, Huminsäuren und zwei Phenazine alternative Elektronenakzeptoren für die Methanoxidation sind (Nauhaus et al. 2005). Einen Hinweis darauf, dass der Transfer von Reduktionsäquivalenten nicht über ein aus dem Methan abgeleitetes Kohlenstoffintermediat verläuft, lieferte eine Studie von Wegener et al. (2008). Sie zeigten, dass nur ANME, nicht aber die SRB <sup>13</sup>C aus <sup>13</sup>CH<sub>4</sub> in die Biomasse einbauen, während nur im Vorhandensein von Methan <sup>13</sup>C aus <sup>13</sup>CO<sub>2</sub> in spezifische Membranlipide der SRB inkorporiert wurde. Letzteres kann man als Hinweis auf eine ANME/SRB-Syntrophie interpretieren. Andererseits ist unklar, ob die Energie-Differenz von maximal etwa -40 kJ pro mol oxidiertes Methan ausreichend ist, um das Wachstum zweier Organismen zu fördern (Schink 1997). Zudem müssten aus thermodynamischen Überlegungen heraus die Konzentrationen der potentiellen Intermediate sehr niedrig sein. Aus diesem Grund schlossen Sørensen et al. (2001) Acetat, Wasserstoff und Methanol als solche aus. Neben der niedrigen Gibbs-Energie stellt auch das Vorkommen von ANME ohne assoziierte Bakterien die Beteiligung von SRB an der AOM in Frage, zumal mit *Archaeoglobus* spp. Archaeen existieren, die mit *aprBA* und *dsrAB* über horizontalen Gentransfer von Bakterien Gene erlangten, die für essentielle Proteine der Sulfatreduktion kodieren. So wäre es denkbar, dass ANME sowohl die Methanoxidation als auch die Sulfatreduktion durchführen. Die Aggregation von ANME und assoziierten Bakterien beweist nicht unmittelbar eine obligate Rolle der Bakterien in der AOM, sondern könnte anders erklärt werden. Möglicherweise profitieren die Organismen z.B. durch den Austausch von Nebenprodukten voneinander. Zudem wurde vorgeschlagen, dass die assoziierten SRB die Konsortien umgebende Polysaccharid-Matrix abbauen (Thauer et al. 2008).

### 6. Ziele der Arbeit

Im Fokus dieser Arbeit stand der weitgehend unbekannt Stoffwechselweg der anaeroben Oxidation von Methan (AOM) mit Sulfat als Elektronenakzeptor. Zu Beginn dieser Arbeit war bekannt, dass Kulturen mit hoher AOM-Aktivität von Konsortien aus anaeroben methanotrophen Archaeen (ANME) und Deltaproteobakterien dominiert werden, und die Aktivierung des Methans sehr wahrscheinlich von ANME in einer Umkehrung der letzten Reaktion der Methanogenese durchgeführt wird. Die Funktion der zu den sulfatreduzierenden Bakterien (SRB) verwandten Deltaproteobakterien war dagegen unbekannt.

**Biochemie der Sulfatreduktion.** Zunächst sollte untersucht werden, ob die Sulfatreduktion in einer hoch aktiven AOM-Kultur über den bekannten Reaktionsweg, d.h. über die Schlüsselenzyme ATP-Sulfurylase, APS-Reduktase und dissimilatorische Sulfitreduktase verläuft. Enzymtests mit dem Proteinextrakt der mikrobiellen Matten aus dem Schwarzen Meer sollten zunächst Aufschluss darüber geben, ob eine hohe Aktivität dieser Enzyme vorliegt und sie daher in den reduktiven Teil der AOM mit Sulfat als Elektronenakzeptor beteiligt sein könnten. Ein weiteres Ziel bestand in der Zuordnung der Sulfatreduktion zu den Archaeen oder den Bakterien. Daher sollten die dominanten Enzyme für die Sulfatreduktion aus den mikrobiellen Matten gereinigt werden, um die Proteine anhand ihrer Aminosäuresequenz phylogenetisch einordnen zu können. Diese Daten könnten dann Hinweise darauf ergeben, welche der beiden Organismen die Sulfatreduktion katalysiert.

**Extrazellulärer Transfer von Reduktionsäquivalenten.** Das am häufigsten angeführte Modell beschreibt AOM als eine syntrophe Interaktion, bei der ein extrazellulärer Transfer von Reduktionsäquivalenten aus der Methanoxidation von den ANME zu den SRB stattfindet. Ein Ziel der Arbeit bestand in der Entwicklung neuer Hypothesen für diese potentielle Elektronenübertragung. Einerseits sollte in physiologischen Experimenten mit hoch aktiven AOM-Anreicherungskulturen die Beteiligung von reduzierten Kohlenstoffverbindungen oder Wasserstoff untersucht werden, mit besonderem Augenmerk auf Methanthiol, da eine neuere Publikation dieses Molekül als Intermediat der AOM vorschlug. Andererseits sollten verschiedene Hypothesen für einen extrazellulären Elektronentransfer über redox-aktive Elektronenüberträger wie Thiole, Flavine, Anthraquinone oder Sulfid/Schwefel geprüft werden. Schließlich sollte in einer Apparatur nach dem Prinzip der mikrobiellen Brennstoffzelle die Möglichkeit eines direkten Elektronentransfers in der AOM studiert werden.

## **B Material und Methoden**

### **1. Mikrobiologische Methoden**

#### **1.1 Medien**

Ein künstliches Meerwassermedium (SRB-Medium) wurde als Grundmedium für die Kultivierung und Anreicherung der marinen Mikroorganismen verwendet (Widdel & Bak 1992). Das Medium enthielt 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 0,76 mM KBr, 8 mM KCl, 28 mM MgCl<sub>2</sub>, 28 mM MgSO<sub>4</sub> und 450 mM NaCl. Nach dem Autoklavieren wurden 30 mM NaHCO<sub>3</sub>, 1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 4,7 mM NH<sub>4</sub>Cl, Spurenelemente und Vitamine hinzugefügt, und das Medium wurde mit 0,5 mM Sulfid reduziert. Sulfatfreies SRB-Medium enthielt 55,5 mM MgCl<sub>2</sub> und kein MgSO<sub>4</sub>. Alle angegebenen Werte sind Endkonzentrationen. Der pH-Wert der Medien betrug 7,2-7,5.

#### **1.2 AOM-Kulturen**

Die mikrobiellen Matten entstammen dem GHOSTDABS-Gebiet (44° 46' N, 31° 60' E) (Michaelis et al. 2002) am nordwestlichen Schelf des Schwarzen Meeres. Im einzelnen wurden sie im Rahmen des Projektes GHOSTDABS im September/Oktober 2004 auf der Ausfahrt POS 317-2 des RV Poseidon (Matten BS P729 und BS P744), auf der Ausfahrt POS 317-3 des RV Poseidon 2004 (Matte BS P784, 43° 57,5' N, 30° 17,3' E; 296 m Wassertiefe und Matte BS P787, 44° 37,7' N, 31° 8,7' E; 243 m Wassertiefe) und auf einer Ausfahrt des RV Meteor im Februar/März 2007 (Matte BS 328-153, GHOSTDABS Station no. 328; 44° 46' 31" N, 31° 59' 25" E; 220 m Wassertiefe) gesammelt. Sedimentproben vom Hydratrücken (Oregon, USA) entstammen einer Ausfahrt des RV Sonne im August 2000 (44° 34' N, 125° 09' W; 780 m Wassertiefe; Nauhaus et al. 2002). Sedimentproben von den Schlammvulkanen Amon (Amon MV, 31° 42,6' E, 32°22,2' N) und Isis (Isis MV, 31° 23,4' E, 32 °21,7' N) wurden auf der NAUTINIL Ausfahrt des RV L'Atalante mit Hilfe des Unterseebootes Nautila (IFREMER) im September 2003 gesammelt (Dupre et al. 2007).

Unmittelbar nach den Probenahmen wurden sowohl alle Sedimente als auch die Schwarzmeermatten in Glasgefäße überführt, und in diesen unter anoxischen Bedingungen aufbewahrt. Im Labor wurden die Proben dann unter einer reinen Methanatmosphäre (2-5 atm, entspricht 1-4 atm Überdruck; Methan 4.5, AirLiquide, Düsseldorf) bei 12°C bzw. 22°C (Amon MV, Isis MV) inkubiert. Diese Inkubationen führten über einen Zeitraum von mehreren Monaten bis Jahren bei regelmäßigem Austausch des Mediums zum Wachstum der

ANME/SRB-Konsortien mit Verdoppelungszeiten im Bereich von mehreren Monaten (s. Nauhaus et al. 2007). Auf diese Weise wurden sedimentfreie AOM-Anreicherungskulturen mit hohen spezifischen AOM-Raten gewonnen (T. Holler & J. Milučká, pers. Mitt.). Tabelle 1 gibt eine Übersicht über die in den biochemischen und mikrobiologischen Experimenten verwendeten Kulturen.

**Tabelle 1.** AOM-Kulturen, ihre Zusammensetzung sowie die spezifischen AOM-Aktivitäten bei 2 atm Methan (zum Teil gemessen als Methan-abhängige Sulfidbildung) pro Gramm Trockengewicht bei 12°C bzw. 22°C (Amon MV und Isis MV).

AOM-Kultur	Spezifische AOM-Aktivität ( $\mu\text{mol g}_{\text{dw}}^{-1} \text{d}^{-1}$ )	Dominante Phylotypen (in % aller Zellen)		Quelle
		ANME-2a/c	DSS	
HR 2000 Sediment, Hydratrücken	<b>12 ± 2</b>	30	60	(Nauhaus et al. 2002) <b>diese Arbeit</b>
HR Anreicherung, Hydratrücken	300	81	18	(Holler et al. 2009)
BS P729, Mikrobielle Matte, Schwarzes Meer	<b>6 ± 3</b>	dominiert von ANME-1/SRB		<b>diese Arbeit,</b> M.Krüger, pers. Mitt.
BS P744, Mikrobielle Matte, Schwarzes Meer	<b>510 ± 40</b>	<b>ca. 45</b>	<b>ca. 45</b>	<b>diese Arbeit</b> #
BS P784, Mikrobielle Matte, Schwarzes Meer	<b>500 ± 00</b>	<b>dominiert von ANME-2/SRB</b>		<b>diese Arbeit</b>
BS P787, Mikrobielle Matte, Schwarzes Meer	<b>520 ± 70</b>	48	49	<b>diese Arbeit,</b> (Holler et al. 2009)
BS 328-153, Mikrobielle Matte Schwarzes Meer	<b>200 ± 20</b>	<b>ca. 45</b>	<b>ca. 45</b>	<b>diese Arbeit</b> #
Amon MV, Anreicherung	2000	69	29	(Holler et al. 2009)
Isis MV, Anreicherung	n.b.	ähnlich Amon MV		T. Holler pers. Mitt.

Fett hervorgehobene Werte wurden im Rahmen dieser Arbeit bestimmt. #Mikroskopische Analyse und Abschätzung der Zellzahlen mittels Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (s. Material und Methoden, Abschnitt B.4.5). n.b. nicht bestimmt.

### 1.3 Reinkulturen

Mikroorganismen wurden von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ, Braunschweig) bezogen. Sofern nicht anders angegeben, erfolgte die Kultivierung aller Stämme anaerob unter einer N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> Atmosphäre (90/10 v/v).

*Desulfosarcina variabilis* DSM 2060<sup>T</sup> und *Desulfobacterium autotrophicum* DSM 3382<sup>T</sup> (Stamm HRM2) wurden in SRB-Medium mit Benzoat (5 mM) bzw. chemolithoautotroph mit H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (80/20 v/v) bei 28°C angezogen. Für *Desulfococcus multivorans* DSM 2059<sup>T</sup>, der ebenfalls bei 28°C wuchs, wurde ein SRB-Medium mit geringerem Salzgehalt gewählt, das 120 mM NaCl, 21,1 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> und 6,4 mM MgCl<sub>2</sub> enthielt, sowie 5 mM Acetat als Elektronendonator.

Alle Schwefel reduzierenden Stämme wurden in sulfatfreiem SRB-Medium bei 22°C oder 28°C angezogen. Dem Medium für *Desulfuromonas acetoxidans* DSM 684<sup>T</sup> wurden 10 mM Acetat bzw. 10 mM Ethanol als Elektronendonator zugesetzt, dem für *Desulfuromonas succinoxidans* DSM 8966 10 mM Succinat. Der Gasraum in den Röhren mit *Sulfurospirillum carboxydovorans* DSM 16295<sup>T</sup> enthielt Kohlenmonoxid (5% CO in N<sub>2</sub>) oder Wasserstoff (1 bar H<sub>2</sub> / CO<sub>2</sub>, 80/20 v/v), wobei letzterer Kultur zusätzlich 0,5 mM Acetat als Kohlenstoffquelle zugesetzt wurde. Als Elektronenakzeptor wurde den Schwefelreduzierern ca. 300 mg (eine Spatelspitze) elementarer Schwefel zugegeben. Der Schwefel war zuvor gründlich im Mörser zerrieben, dann in Wasser durch abwechselndes Anlegen eines Vakuums und plötzliches Begasen benetzt und suspendiert, und anschließend 25 Minuten bei 114°C autoklaviert worden.

*Desulfocapsa sulfexigens* DSM 10523<sup>T</sup> wurde als Schwefel-Disproportionierer in sulfatfreiem SRB-Medium mit solubilisiertem elementarem Schwefel bei 28°C kultiviert, wobei der Kultur mehrfach Fe(OH)<sub>3</sub> bis zu einer Konzentration von 25 mM zugesetzt wurde, um das entstehende Sulfid als Eisensulfid auszufällen.

*Geobacter sulfurreducens* DSM12127<sup>T</sup> (Stamm PCA) wurde in Süßwassermedium angezogen, das 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 6,7 mM KCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 51,3 mM NaCl, 0,5 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> enthielt. Nach dem Autoklavieren wurden wie beim SRB-Medium 30 mM NaHCO<sub>3</sub>, 1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 4,7 mM NH<sub>4</sub>Cl, Spurenelemente und Vitamine hinzugefügt (Widdel & Bak 1992); Acetat (10 mM) wurde als Elektronendonator und Fumarat (40 mM) als Elektronenakzeptor eingesetzt. *G. sulfurreducens* wurde von Alexander Galushko zur Verfügung gestellt, *D. autotrophicum* von Daniela Lange.

### 1.3 Anreicherungs- und Isolierungsversuche

Für Isolationsversuche wurden Verdünnungsreihen von verschiedenen AOM-Anreicherungen (Hydratrücken, Schwarzes Meer, Amon MV und Isis MV) und den mikrobiellen Matten aus dem Schwarzen Meer in Flüssigmedium und in Agar mit verschiedenen Substraten und Substratkombinationen angelegt. Vor der Verdünnung wurden die Flocken bildenden sedimentfreien AOM-Anreicherungskulturen sowie die Schwarzmeermatten zunächst mit einem Glashomogenisator (Wheaton, Millville, NJ, USA) zerrieben, um Einzelzellen von ANME und SRB von den Konsortien abzuspalten. Diese Vorbehandlung erfolgte in einer Anaerobenkammer (Mecaplex, Grenchen, Schweiz) unter  $N_2/CO_2$ -Atmosphäre (90/10 v/v) und unter besonderer Vorsicht, da bei zu starker physischer Einwirkung die AOM-Raten stark abnahmen (Daten nicht gezeigt).

Flüssigverdünnungsreihen wurden in mit Butylgummi verschlossenen Glasröhrchen (Hungate-Röhrchen) angelegt. Für die Agar-Verdünnungsreihen (Widdel & Bak 1992) wurde mehrfach gewaschener Agar verwendet. Nach dem Abkühlen wurde der Gasraum der Glasröhrchen unter Zuhilfenahme der Hungate-Technik (Bryant 1972) gegen  $N_2/CO_2$  (90/10 v/v) ausgetauscht, oder gegen  $H_2/CO_2$  (80/20 v/v), falls Wasserstoff als Elektronendonator dienen sollte.

Versuche zur Isolierung und Anreicherung von ANME wurden in sulfatfreiem SRB-Medium mit den Substraten  $H_2/CO_2$  (80/20 v/v, 1 atm), Kohlenmonoxid (5–20% in  $N_2/CO_2$ ; 1 atm), Formiat (10 mM), Acetat (5–10 mM), Methanol (10 mM), Methanthiol (2 mM), Hexamethylentetramin (100  $\mu$ M, „fed-batch“), Formiat und Methanol sowie Wasserstoff und Methanol in Kombination durchgeführt. Ferner wurden Methan, Wasserstoff und Formiat als Elektronendonatoren in Kombination mit Polysulfid (10 mM  $Na_2S_3$ ) als Elektronenakzeptor getestet, wobei der pH-Wert des Mediums durch Zugabe von HCl neutralisiert wurde.

Ansätze zur Isolierung von SRB wurden in SRB-Medium mit Methan (2 atm, Agar-Verdünnungsreihen im Hungate-Röhrchen),  $H_2/CO_2$  (80/20 v/v, 1 atm), Kohlenmonoxid (5%, 1 atm), Formiat (10 mM), Acetat (5–10 mM), Methanol (10 mM), Methanthiol (2 mM) oder Hexamethylentetramin (100  $\mu$ M) als Elektronendonator angefertigt. Einigen Verdünnungen der Schwarzmeermatten (BS 328-153) mit Acetat bzw. Formiat als Elektronendonatoren wurde zusätzlich 5% filtrierter Überstand aus Schwarzmeermatten zugesetzt, um einen möglichen Vitamin- oder Spurenelementbedarf zu decken. Des Weiteren wurde versucht, Acetat und Formiat kontinuierlich langsam zuzuführen, um die Substratkonzentration niedrig zu halten.



In elektrochemischen Zellen wurde die Anreicherung von ANME mit Methan als Elektronendonator und einer Graphitelektrode als Elektronenakzeptor ebenso versucht wie die Anreicherung von SRB auf einer Graphitelektrode als Elektronendonator.

Zudem sollten Methanogene auf TMA (2,5–10 mM) und Methanol (5–10 mM) aus AOM-aktiven Kulturen angereichert werden, um simultan möglicherweise eine Anreicherung spezieller SRB als Begleitorganismen zu erreichen.

### **1.4 Inkubationsexperimente zum Mechanismus der AOM**

Alle Versuche zum physiologischen Mechanismus der AOM wurden mit sehr aktiven Anreicherungskulturen, den mikrobiellen Matten aus dem Schwarzen Meer, oder Sedimenten vom Hydratrücken (Tab. 1) durchgeführt. Dabei wurden die Versuche in einer Anaerobenkammer (Mecaplex, Grenchen, Schweiz) unter einer N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>-Atmosphäre (90/10 v/v) angesetzt. Die Kulturen wurden in SRB-Medium suspendiert, wobei die mikrobiellen Matten zuvor homogenisiert wurden (Abschnitt B.1.3). Die Suspension wurde auf 5–20 ml Glasröhrchen oder 70–156 ml Glasflaschen verteilt. Die zur Hälfte gefüllten Gefäße wurden mit Butylgummisepten verschlossen. Sollte die Methan- oder Wasserstoffabnahme über die Zeit bestimmt werden, wurden die Gefäße komplett gefüllt. Bei den Probenahmen wurde das Probenvolumen durch neues Medium ersetzt. Dabei wurde darauf geachtet, dass während der Beprobung der Druck konstant blieb.

Um potentielle Elektronenüberträger zwischen ANME und SRB aufzufinden, wurden nach Zusatz verschiedener redox-aktiver Verbindungen geprüft, ob diese in Kurzzeit-Experimenten innerhalb weniger Tage i) die Sulfatreduktion stimulieren und/oder ii) als mögliches Produkt der AOM diese inhibieren. Zudem wurde z.T. geprüft, ob niedrige Konzentrationen der redox-aktiven Verbindungen AOM stimulieren. Diese Versuche beruhen auf der Überlegung, dass der Elektronentransfer der Raten-begrenzende Schritt ist, und durch die Erhöhung der Konzentration eines Überträgers die AOM-Rate ansteigt.

Substratzugaben und Beprobungen wurden außerhalb der Anaerobenkammer mit zuvor mit Stickstoff gespülten Spritzen durchgeführt. Zur Bestimmung der Methan-abhängigen Sulfatreduktion wurde der Gasraum mit Methan gespült und befüllt (2 atm, entspricht 1 atm Überdruck). Wasserstoff und CO wurden zum Teil ebenfalls in den Gasraum gegeben. Während der Inkubation wurden alle Röhrchen horizontal inkubiert geschwenkt, um Diffusionslimitierungen zu vermeiden, mit Ausnahme der Experimente zur Bestimmung der Temperaturabhängigkeit, in denen die Glasröhrchen in Wasserbädern standen. Neben den Proben zur Bestimmung der Sulfidkonzentration wurden zum Teil auch Proben für die

Bestimmung der Konzentration von Sulfat, Methan, Wasserstoff, CO, und organischer Säuren genommen.

Um zu testen, ob niedrige Konzentrationen von Cystein (100  $\mu\text{M}$ ) oder Cystin (50  $\mu\text{M}$ ) die AOM stimulieren, wurde deren Effekt auf den Umsatz von  $^{14}\text{CH}_4$  zu  $^{14}\text{CO}_2$  bestimmt. In den Experimenten wurden 5,23 ml Glasröhrchen komplett mit einer Suspension aus Sediment vom Hydratrücken (HR 2000, 525 mg Trockengewicht) und  $^{12}\text{C}$ -Methan-gesättigtem SRB-Medium befüllt (1 atm), und pro Ansatz wurden 2,8 kBq  $^{14}\text{CH}_4$  zugesetzt. Die Inkubation erfolgte für drei Tage bei 12°C.

### 1.5 Kokultur-Experimente mit Zellsuspensionen

In einigen Experimenten zur Aufklärung des physiologischen Mechanismus der AOM wurden eine AOM-Anreicherungskultur aus dem Mittelmeer (Amon Mud Vulcano) bzw. eine Suspension von homogenisierter mikrobieller Matte aus dem Schwarzen Meer (Probe 328-153) mit Zellsuspensionen von Schwefel-reduzierenden Bakterienstämmen versetzt. Hierbei wurde die Möglichkeit geprüft, ob in den AOM-Kulturen eine Komproportionierung von Sulfid und Sulfat zu Polysulfid oder Schwefel stattfindet, der von einem Schwefelreduzierer genutzt werden könnte. Für diesen (unüblichen) Zusatz einer Reinkultur zu einer undefinierten Mischkultur wird hier der Begriff Kokultur verwendet, der üblicherweise eine definierte Mischkultur aus zwei Organismen bezeichnet.

Die Vorkulturen von allen Schwefel-reduzierenden Stämmen wurden in sulfatfreiem SRB-Medium mit dem gleichen Elektronendonator angezogen, der auch im Kokultur-Versuch eingesetzt wurde und anschließend bei  $17.000 \times g$  für 25 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet einmal mit SRB-Medium gewaschen. Die Zellen wurden erneut abzentrifugiert und schließlich in SRB-Medium resuspendiert, wobei insgesamt eine Aufkonzentrierung auf Zelldichten zwischen  $2,8 \times 10^8 \text{ ml}^{-1}$  (*D. salexigens*) und  $3,3 \times 10^9 \text{ ml}^{-1}$  (*S. carboxydovorans* gewachsen auf Kohlenmonoxid) erreicht wurde. Alle Zentrifugations- und Suspensionsschritte wurden unter anoxischen Bedingungen durchgeführt. In den Experimenten wurde 1 ml der Zellsuspensionen zu ca. 10 ml der in SRB-Medium suspendierten AOM-Kultur gegeben. Die Inkubationen erfolgten in 20 ml Hungate-Röhrchen unter  $\text{N}_2/\text{CO}_2$  (90/10 v/v) oder  $\text{CH}_4$  (1 bar) bei 22°C. Zu mehreren Zeitpunkten wurde die Sulfidkonzentration bestimmt.

Zusätzlich wurden Agar-Verdünnungsreihen angesetzt, um die potentiell Sulfid verwertenden SRB als Misch-Kolonie mit einem Schwefelreduzierer zu isolieren. Vorverdünnungen von der AOM-Anreicherung (Amon Mud Vulcano) und der

homogenisierten Schwarzmeermatte wurden mit etwa  $10^7$  Zellen  $\text{ml}^{-1}$  von *D. acetoxidans* oder *D. succinoxidans* versetzt und dienten anschließend als Inokulum für die Verdünnungsreihen in 1% Agar. Das Wachstum von Kolonien wurde in Abhängigkeit von der Substratzugabe und im Vergleich zu einer nicht mit *Desulfuromonas* spp. beimpften Kontrolle beobachtet.

In einem weiteren Experiment wurde untersucht, ob der Schwefel zu Sulfat und Sulfid disproportionierende Stamm *Desulfocapsa sulfexigens* DSM 10523 in Kokultur mit *D. acetoxidans* DSM 684 auch eine Komproportionierung von Sulfid und Sulfat zu Polysulfid katalysiert. Dazu wurde der Überstand der *Desulfocapsa*-Kultur nach dem Absetzen der Eisensulfidpräzipitate und der Schwefelflocken in Hungate-Röhrchen übertragen und etwa 1:2 in SRB-Medium verdünnt. Dies resultierte in einer Zelldichte von ca.  $10^6$  Zellen  $\text{ml}^{-1}$ . Einige Röhrchen wurden mit *D. acetoxidans* inokuliert ( $7 \times 10^7$  Zellen  $\text{ml}^{-1}$ ) und/oder mit 5 mM Acetat versetzt. Die Ansätze wurden bei  $28^\circ\text{C}$  auf dem Schüttler ( $24 \text{ min}^{-1}$ ) inkubiert.

### 1.6 Versuche zum Elektronentransfer in einer elektrochemischen Zelle

Die elektrochemische Zelle (oder mikrobielle Brennstoffzelle, MFC) bestand aus zwei Glasflaschen (Abb. 9), die durch eine Kationen-selektive Membran (Ultrex, Membranes International Inc.) getrennt wurden. Das Anodenkompartiment (so wird der äußere Minuspol in MFCs genannt) besaß ein Volumen von ca. 600 ml und die Kathodenzelle eines von ca. 300 ml. Die Membran wurde vor dem Einsatz über Nacht in 0,5 M NaCl inkubiert. Sie wurde mittels einer SVL42-Kupplung zwischen zwei Dichtungsringen aus Butylgummi eingespannt. Die gesamte Verbindungsstelle beider Zellen wurde mit selbst verschweißendem Gewebeklebeband aus Butylkautschuk (RS Components, Mörfelden-Walldorf, Deutschland) umwickelt, um die Sauerstoffdiffusion zu mindern. Als Anode und Kathode wurden zunächst planare Graphitelektroden ( $45 \text{ cm}^2$  Anodenoberfläche, Phywe Systeme, Göttingen, Deutschland) verwendet, in weiteren Experimenten dann Graphit-Weichfilz ( $113 \text{ cm}^2$ , Carbon Industrie Produkte, Buchholz, Deutschland), der eine größere Oberfläche besitzt. Sowohl Graphitfilz als auch Graphitplatten wurden an runden Graphitelektroden (Phywe, Göttingen) befestigt. Dabei wurden die Graphitstäbe an dem Ende, das durch den Butylgummistopfen (GL 45) nach außen geführt wurde, zuvor durch Eintauchen in warmes Paraffin abgedichtet. Hierdurch konnte die Sauerstoffdiffusion in die Zellen verringert werden (Abb. 8). Die Referenzelektrode, eine Ag/AgCl-Elektrode, wurde in die Anodenzelle eingebracht. Zu ihrer Herstellung wurde ein chlorierter Silberdraht zunächst an einen dünnen, außen lackierten Kupferdraht gelötet. Die Lötstelle wurde mit wasserfestem Zweikomponentenkleber verklebt.

Der chlorierte Silberdraht wurde im Inneren einer Pasteurpipette in 1% Agar eingebettet, der KCl (3 M) enthielt. Auf das schmale Ende der Pasteurpipette wurde ein ca. 20 cm langer Tygon<sup>®</sup> 3603-Schlauch (0,8 mm Durchmesser) gesteckt, der mit 1% Agar + 3 M KCl gefüllt war, um die Diffusionsstrecke des Sulfids zum Silberdraht zu verlängern. Das Redoxpotential der Ag/AgCl-Elektrode ist dabei primär über das Löslichkeitsprodukts des Silberchlorides durch die Chloridkonzentration bestimmt. Bei 12°C beträgt es +248 mV gegenüber einer Standardwasserstoffelektrode (NHE;  $E^{\circ}[\text{H}_2 / 2\text{H}^+] = 0 \text{ mV}$ ).

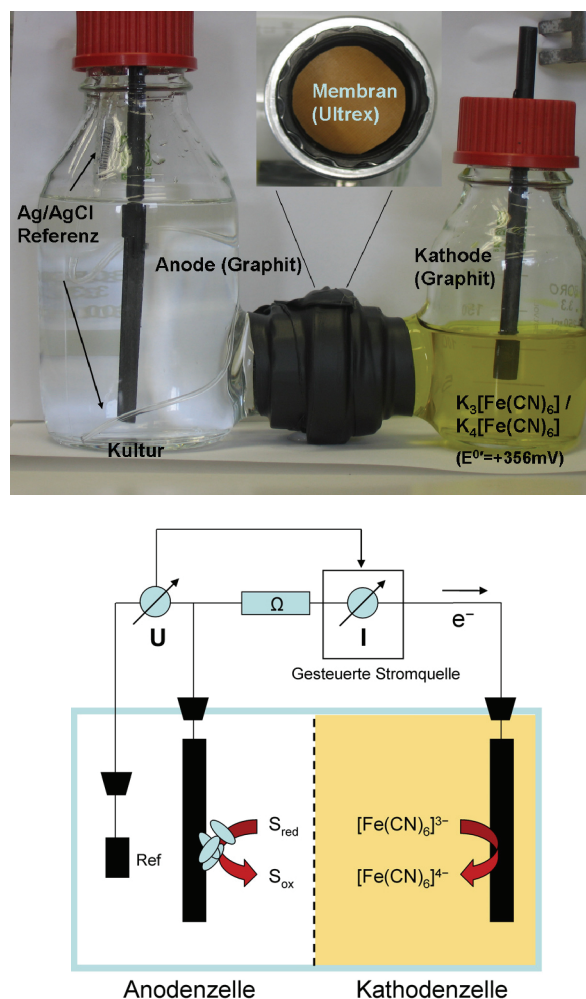


**Abbildung 8.** Oxidation des SRB-Mediums, verdeutlicht durch den Farbumschlag des Indikators Resazurin (rechts). Das Medium blieb reduziert, wenn der Graphitstab im oberen Teil mit Paraffin versiegelt wurde (links), was auch anhand der FeS- Präzipitate sichtbar ist.

Das Potential von Anode gegen Kathode und Anode gegen Referenz wurde mit Hilfe von hochohmigen Millivoltmetern gemessen. Mit Hilfe eines Ampèremeters konnte der Stromfluß zwischen Anode und Kathode bis in den Bereich von 1  $\mu\text{A}$  detektiert werden. Über einen Potentiostaten wurde das Potential der Arbeitselektrode (meistens der Anode) gegenüber der Referenz eingestellt. In die Arbeitskammer wurde die Kultur gegeben, in der Gegenkammer befand sich ein Gemisch aus rotem (oxidiertem) und gelbem (reduziertem) Kaliumhexacyanoferrat (10 mM  $\text{K}_4(\text{Fe}[\text{CN}]_6)$  / 100 mM  $\text{K}_3(\text{Fe}[\text{CN}]_6)$ ;  $E^{\circ} = +356 \text{ mV}$ ) in 30 mM  $\text{NaHCO}_3$ . Beide Formen des Kaliumhexacyanoferrat reagieren mit Graphitelektroden. Sollte die Anode auf ein negatives Potential gegenüber der Referenz gebracht werden, so diente  $\text{K}_4(\text{Fe}[\text{CN}]_6)$  als Elektronendonator. Ampèremeter, Voltmeter, Potentiostat, Analog-Digital-Wandler und Verstärker sind Eigenentwicklungen der Elektronikwerkstatt des Max-Planck-Instituts für marine Mikrobiologie (Bremen).

Vortests wurden mit SRB-Medium durchgeführt, das mit Sulfid reduziert wurde. Der Effekt des Sulfides, des pH-Wertes und des Spülen des Gasraumes auf das Potential wurde

untersucht. Zusätzlich wurde der Versuchsaufbau mit einer Reinkultur von *Geobacter sulfurreducens* Stamm PCA getestet, der Acetat-abhängig Elektronen auf eine Graphitelektrode übertragen kann (Bond & Lovley 2003). Das Anodenkompartiment wurde mit 10% aus einer auf Acetat und Fumarat gewachsenen Stammkultur inokuliert, wobei die Zelle 5 mM Acetat als Elektronendonator und nur die Elektrode als Elektronenakzeptor enthielt. Die Stromstärke wurde über einen Widerstand von 500  $\Omega$  gemessen und die Entwicklung des Anodenpotentials gegenüber der Referenz verfolgt.



**Abbildung 9.** Aufbau der elektrochemischen Zelle (oben) und Schema des potentiostatischen Betriebes (unten)

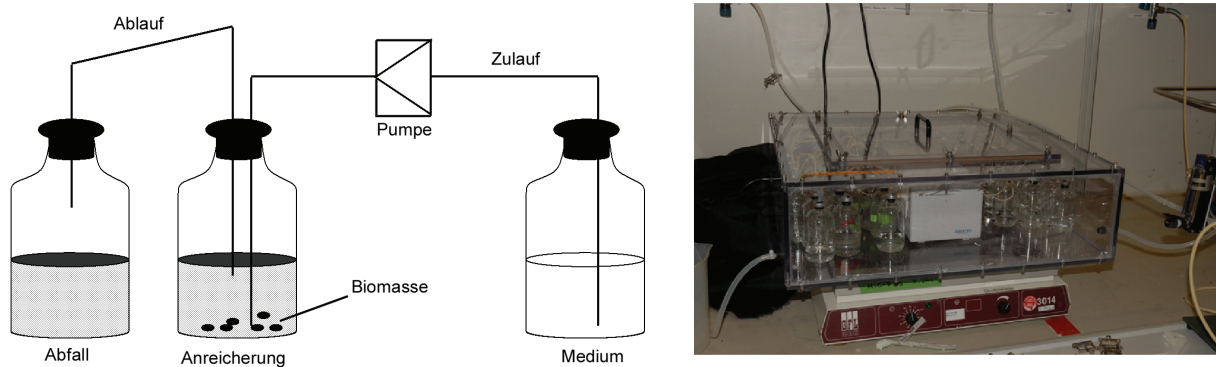
Nach den Vorversuchen wurde die Anodenzelle mit 400 ml einer Suspension aus mikrobiellen Matten aus dem Schwarzen Meer (Probe P784; 4,6 mg Trockengewicht  $\text{ml}^{-1}$ ) in Sulfat-freiem SRB-Medium inokuliert, um zu testen, ob AOM an den Transfer von Elektronen auf Elektroden statt an Sulfatreduktion gekoppelt werden kann, und ob sich ANME oder die SRB dabei an der Anode anreichern. Im Gasraum einer Zelle befand sich  $N_2$  (1,5 atm), in der

anderen  $\text{CH}_4$  (1,5 atm). Das Anodenpotential wurde auf  $-150$  mV bzw.  $-177$  mV vs. NHE eingestellt („poised potential“) und die Stromproduktion über die Zeit verfolgt (Abb. 9). Die Zugabe der Gase in den Gasraum sowie die Beprobung für die Kultur erfolgte durch den GL45-Butylgummistopfen oder durch separate Öffnungen (nicht abgebildet).

Der Zusammenhang zwischen Stromfluß und Rate der Oxidation eines Elektronendonators kann über die Faraday-Konstante ( $96.485 \text{ C mol}^{-1}$ ) berechnet werden. Ein Stromfluß von  $1 \text{ A}$  ( $1 \text{ C s}^{-1}$ ) entspricht demnach  $1,04 \times 10^{-5} \text{ mol}$  Elektronen pro Sekunde.

### 1.7 Semi-kontinuierliche Kultivierung von TMA- und Methanol-abbauenden methanogenen Konsortien

Anreicherungen für Methanogene wurden in  $20 \text{ ml}$  Hungate-Röhrchen oder  $156 \text{ ml}$  Serumflaschen mit  $5\text{--}10 \text{ mM}$  TMA oder  $5\text{--}10 \text{ mM}$  Methanol angesetzt. Als Inokula dienten aktive AOM-Kulturen (Abschnitt B.1.1). Die Methan- und Sulfidentwicklung in den Kulturen wurde über die Zeit verfolgt, und Kulturen, die neben einer Methanogenese auch geringe Mengen Sulfid produzierten, wurden in neue Hungate-Röhrchen transferiert oder in die semi-kontinuierliche Kultur überführt (Abb. 10).



**Abbildung 10.** Schematische Darstellung der semi-kontinuierlichen Kultivierung (linke Seite) und Versuchsaufbau in der anoxischen Polycarbonatbox (rechte Seite).

Die  $156 \text{ ml}$  Vorratsgefäße enthielten  $100 \text{ ml}$  SRB-Medium mit  $2,5 \text{ mM}$  TMA oder  $5 \text{ mM}$  Methanol. Die methanogenen Kulturen, ebenfalls in  $156 \text{ ml}$  Serumflaschen, waren über Pharmed BPT<sup>®</sup>-Schläuche und -Pumpschläuche mit dem  $156 \text{ ml}$  Vorratsgefäß verbunden und wurden über eine Pumpe (IPC24, Ismatec, Wertheim, Deutschland) mit Medium versorgt. Die Durchflußrate wurde auf  $3 \mu\text{l min}^{-1}$  eingestellt. Entwickelte sich ein Überdruck im Kulturgefäß, so konnte Kulturflüssigkeit über einen weiteren Tygenschlauch in eine weitere  $156 \text{ ml}$  Serumflasche ablaufen. Die Flocken-bildende Biomasse konnte so größtenteils im

Kulturgefäß verbleiben. Um anoxische Bedingungen zu gewährleisten, wurde der gesamte Versuch in einer Stickstoff-gespülten Polycarbonatbox betrieben, die zudem langsam geschwenkt wurde ( $20 \text{ min}^{-1}$ ). Ein Austausch des Vorratsgefäßes erfolgte ca. alle 10–14 Tage. Zum gleichen Zeitpunkt wurden der Überdruck im Kulturgefäß, die Methankonzentration im Gasraum des Kulturgefäßes, die Sulfidproduktion sowie das Volumen der Flüssigkeit in Vorratsgefäß, Kulturgefäß und Überlauf bestimmt.

## 2. Analytische Methoden

### 2.1 Trockengewichtsbestimmung

Sedimente und mikrobielle Matten wurden abzentrifugiert und das Nassgewicht der mikrobiellen Matten wurde nach sorgfältiger Entfernung des Mediums ermittelt. Die Bestimmung des Trockengewichtes erfolgte nach der Trocknung des Pellet für 48 Stunden bei  $80^\circ\text{C}$ .

### 2.2 Gaschromatographie

Methan wurde mit Hilfe eines GC14B Gaschromatographen (Shimadzu, Kyoto, Japan) bestimmt, der mit einer Supel-Q Plot-Säule ( $30 \text{ m} \times 0.53 \text{ mm}$ ; Supelco) und einem Flammenionisationsdetektor ausgestattet war. Der Trägergasstrom betrug  $3 \text{ ml N}_2 \text{ min}^{-1}$ , die Ofentemperatur  $110^\circ\text{C}$ .

Die Auftrennung von Wasserstoff und Kohlenmonoxid erfolgte auf einem  $5 \text{ \AA}$  Molekularsieb mit Stickstoff als Trägergas bei  $40^\circ\text{C}$ , die Quantifizierung mit Hilfe eines Thermoleitfähigkeitsdetektors (Harder 1997).

In Experimenten, die keinen Gasraum enthielten, wurden die Gaskonzentrationen in Flüssigkeiten bestimmt. Dazu wurden definierte Volumina der Flüssigkeiten in geschlossene Glasgefäße mit gesättigtem NaCl und definiertem Gasraum injiziert. Unterproben aus dem Gasraum wurden in den gaschromatographisch analysiert.

### 2.3 Bestimmung von Sulfid

Proben für die Sulfid- oder Sulfatbestimmung wurden in Zinkacetat ( $33 \text{ g l}^{-1}$ ) fixiert. Sulfid wurde photospektrometrisch quantifiziert, als colloidales CuS (Cord-Ruwisch 1985) oder durch die Reaktion mit *N,N*-dimethyl-*p*-Phenylendiamin zu Metylenblau (Cline 1969). Letzterer Assay wurde miniaturisiert auf ein Gesamtvolumen von  $1,25 \text{ ml}$  im Plastik-Reaktionsgefäß.

## 2.4 Bestimmung von Eisen

$\text{Fe}^{2+}$  wurde photometrisch mit Ferrozin bestimmt (Stookey 1970). Dabei wurde zunächst 0,1 ml der Probe mit 0,9 ml 1 M HCl versetzt und 20 Minuten bei 100°C inkubiert, um das säurelösliche Eisen zu extrahieren. Das gesamte säurelösliche Eisen wurde nach Reduktion mit 9 Volumina 10% Hydroxylamin-HCl in 1 M HCl bestimmt, wonach sich die Konzentration von Fe(III) aus der Subtraktion des  $\text{Fe}^{2+}$  von Fe(gesamt) ergibt.

## 2.5 Bestimmung von Fettsäuren, Zuckern und Alkoholen per HPLC

Formiat, Acetat, Propionat, Ethanol und Methanol wurden per HPLC getrennt (Rabus et al. 1996). Die Auftrennung wurde auf einer  $300 \times 7,8$  mm SS-100 Trennsäule (Sierra Separations / Sykam – Jansen) mit 5 mM  $\text{H}_2\text{SO}_4$  bei 60°C und einer Flussrate von  $0,6 \text{ ml min}^{-1}$  erreicht. Die Detektion erfolgte mittels eines RI-Detektor (ERC-7515A, ERC Company, Japan). Für die Detektion von Fettsäuren im unteren  $\mu\text{mol}$ -Bereich wurden die Fettsäuren mit 2-Nitrophenylhydrazide derivatisiert (Albert & Martens 1997).

## 2.6 Bestimmung von Sulfat

Proben zur Sulfatbestimmung wurden zuvor in Zinkacetat ( $33 \text{ g l}^{-1}$ ) fixiert, um eine Oxidation anderer Schwefelverbindungen zu Sulfat zu vermeiden. Sulfat wurde gravimetrisch als  $\text{BaSO}_4$  (Nauhaus et al. 2002) oder über Anionen-Austauschchromatographie bestimmt. Die Auftrennung der Ionen geschah bei letzterer Methode durch unterschiedliche Affinität zum Laufmittel (1 mM Isophthalsäure in 10 % Methanol, pH 4,5) und zu einer Anionenaustauschsäule (I.C.-Pak Waters 4.6\*50 mm, Säulen Nr.: WAT 007355, Waters, Dublin, Irland). Die Menge der eluierten Ionen wurde mittels eines Leitfähigkeitsdetektors (Model 430 Leitfähigkeitsdetektor, Waters) ermittelt.

## 2.7 Bestimmung der AOM mittels des Umsatzes von $^{14}\text{CH}_4$ zu $^{14}\text{CO}_2$

Zur *in vitro*-Messung der Raten der anaeroben Oxidation von Methan wurden kleine Hungate-Röhrchen (Volumen 5,23 ml) mit methangesättigtem Sedimentslurry (ca. 1,4 mM  $\text{CH}_4$ ) gefüllt und mit einem Butylseptum blasenfrei verschlossen. Danach wurde der Tracer ( $^{14}\text{CH}_4$  gelöst in Wasser) durch das Septum injiziert.

Um die mikrobiologische Aktivität zu stoppen, wurde der komplette Slurry in Glasgefäße überführt, die 25 ml NaOH (2,5% v/v) enthielten. Der hohe pH-Wert führte dazu, dass  $\text{CO}_2$  in Lösung ging, während Methan weiterhin nahezu vollständig im Gasraum vorlag.



Zur Bestimmung von radioaktiv markiertem Methan wurde eine nach Iversen und Jørgensen (1985) veränderte Methode verwendet. Dazu wurde der Gasraum des Proben enthaltenden Glasgefäßes nach der Überführung in NaOH mit künstlicher Luft ( $25 \text{ ml min}^{-1}$ ) ausgetrieben und bei  $850^\circ\text{C}$  komplett zu  $^{14}\text{CO}_2$  oxidiert. Das entstandene  $\text{CO}_2$  wurde in 20 ml Szintillationsröhrchen aufgefangen, die 7 ml Ethylenglycolmonomethylether und 1 ml Phenylethylamin enthielten. Nach der Zugabe von 10 ml Szintillationscocktail (Ultima Gold XR, Packard, Packard Bioscience, Perkin Elmer, Boston, USA) wurde die Radioaktivität der Probe in einem Szintillationszähler (2500TR LSC, Packard) bestimmt. Den Berechnungen der  $^{14}\text{CH}_4$ -Konzentration wurde eine empirisch bestimmte Wiederfundrate von 96,5% (T. Treude, pers. Mitteilung) zugrunde gelegt. Als Kontrollen der abiotischen Oxidation von  $^{14}\text{CH}_4$  während der Inkubation wurden nach der Inkubation 5 mit Slurry gefüllte Hungate-Röhrchen mit dem Tracer versetzt und sofort in Gläser mit 25 ml NaOH (2,5% v/v) gegeben. Die Gläser wurden zügig mit Gummistopfen gasdicht verschlossen, geschüttelt und bei Raumtemperatur bis zur Analyse aufbewahrt.

Zur Bestimmung des Gehaltes an  $^{14}\text{CO}_2$  wurde eine nach Boetius et al. (2000a) veränderte Methode genutzt. Dazu wurde die Probe in einen 250 ml Erlenmeyerkolben überführt, mit einem Tropfen Antifoam (Siliconeulie Antiskum SE2, Bie&Berntsen, Åbyhøy, Dänemark) versetzt und gasdicht verschlossen. Anschließend wurde die Flüssigkeit mit 6 ml 6 M HCl angesäuert. Das in den Gasraum übergegangene  $\text{CO}_2$  wurde in einem 6 ml Szintillationsröhrchen mit 1 ml NaOH (0,5 mM) und 1 ml Phenylethylamin aufgefangen. Die Erlenmeyerkolben wurden für vier Stunden bei Raumtemperatur geschüttelt ( $90 \text{ min}^{-1}$ ), so dass alles  $\text{CO}_2$  im Szintillationsröhrchen gebunden war. Nach der Zugabe von 3 ml Ultima Gold XR wurde die Radioaktivität der Probe im Szintillationszähler bestimmt. Die spezifische, auf das Trockengewicht (dw) und die Inkubationszeit (t) bezogene AOM-Rate wurde nach Gleichung 11 berechnet (Treude 2003), wobei  $^{14}\text{CO}_2$  die Radioaktivität des produzierten Kohlendioxids und  $^{14}\text{CH}_4$  die Radioaktivität des restlichen Methans und  $\text{CH}_4$  die Gesamtmenge des Methans in der Probe angeben.

$$\text{AOM} = \frac{{}^{14}\text{CO}_2 \times \text{CH}_4 (\text{gesamt})}{{}^{14}\text{CH}_4 \times \text{dw} \times t} \quad (11)$$

### 3. Biochemische Methoden

#### 3.1 Zellaufschluß

Zellen der Reinkulturen wurden bei  $17.000 \times g$  für 25 Minuten abzentrifugiert und in 50 mM MOPS-KOH pH 7 gewaschen, wobei der Puffer NaCl und  $MgCl_2$  in den Konzentrationen des entsprechenden Kulturmediums enthielt. Die Zellen wurden erneut abzentrifugiert und in 50 mM MOPS-KOH pH 7 resuspendiert. Die mikrobiellen Matten aus dem Schwarzen Meer (Proben P729, P744, und 328-153) wurden in kleine Stücke geschnitten und homogenisiert (Glashomogenisator, Wheaton, Millville, NJ, USA).

Der Zellaufschluß erfolgte mit Ultraschall (Bandelin Sonopuls HD 2200, Kegelspitze KE76, 80 Watt, 10–25 min, je nach Menge der Zellen) auf Eis. Zelltrümmer und Karbonate wurden bei  $18.000 \times g$  für 20 Minuten abzentrifugiert. Der zellfreie Extrakt enthielt ca. 10–15 mg Protein pro Gramm Nassgewicht im Falle der mikrobiellen Matten und 40 mg Protein pro Gramm Nassgewicht bei den Reinkulturen. Die lösliche Proteinfraction wurde durch Ultrazentrifugation bei  $150.000 \times g$  für eine Stunde von der Membranfraction getrennt. Alle Zentrifugationsschritte, Zellaufschluß und die Proteinreinigung wurden unter anoxischen Bedingungen durchgeführt.

#### 3.2 Proteinreinigung und -analyse

Zur Reinigung von ATP-Sulfurylase, APS-Reduktase und dissimilatorischer Sulfitreduktase aus den mikrobiellen Matten (Proben P744 und 328-153) wurde die lösliche Proteinfraction mit Ammoniumsulfat ( $(NH_4)_2SO_4$ ; 20% Sättigung) versetzt, um unbekannte Substanzen zu fällen, die in der SDS-PAGE zu einem Verschmieren der Proteinbanden führten. Präzipitate wurden durch Zentrifugation bei  $18.000 \times g$  für 20 Minuten entfernt. Bei Proteinextraktionen aus den mikrobiellen Matten BS 328-153 wurde auf die Ammoniumsulfatfällung verzichtet. Nach dem Entsalzen wurde die Proteine der löslichen Proteinfraction durch Anionenaustauschchromatographie (HiTrap Q HP, 5 ml, GE Healthcare, Freiburg, Germany) aufgetrennt. Es wurde bewusst direkt eine hochauflösende Säule verwendet, da wenig Gesamtprotein zur Verfügung stand. Diese wurde mit MOPS-KOH pH 7 equilibriert. Die Proteine wurden mit einem linearen Gradienten von 0–0,6 M NaCl eluiert. Alle Schritte der Proteinreinigung wurden bei 8–18°C unter anoxischen Bedingungen durchgeführt.

Die Untereinheiten der Proteine in den aufgefangenen Fractionen wurden per Natriumdodecylsulfat-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt (Laemmli 1970) und mit Coomassie Brilliant Blue G-250 angefärbt. Die Proteine wurden mittels „Mini Trans-Blot<sup>®</sup>

Electrophoretic Transfer Cell“ (Biorad) auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)–Membran aufgebracht und die N-terminale Aminosäuresequenz ausgewählter Proteinbanden wurde bestimmt (Protein Analytics, Gießen, Germany).

### 3.3 Bestimmung von Proteinkonzentrationen und von Enzymaktivitäten

Alle Enzymaktivitäten wurden in photometrischen Assays bestimmt. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach Bradford (1976).

Die Aktivität der ATP-Sulfurylase wurde in der Richtung der ATP-Bildung in einem gekoppelten Assay ermittelt (Dahl & Trüper 1994). Die Reaktionsmischung enthielt 20 mM Glucose, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,5 mM Na-NADP, 1 mM Na<sub>2</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, 3 U Hexokinase, 3 U Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase in 100 mM Tris-HCl und den Enzymextrakt. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 0,05 mM APS gestartet. Die Reduktion des NADP über die Zeit wurde bei 340 nm verfolgt ( $\epsilon_{340} = 6,22 \text{ cm}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ ). Eine Einheit (U) wurde als 1  $\mu\text{mol}$  gebildetes ATP aus APS pro Minute definiert.

APS-Reduktase-Aktivität wurde in Richtung der Sulfitoxidation bei gleichzeitiger Reduktion von K<sub>3</sub>(Fe[CN]<sub>6</sub>) ( $\epsilon_{420} = 1,02 \text{ cm}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ ) bestimmt (Kobayashi et al. 1975). Jeder Ansatz enthielt 1 mM K<sub>3</sub>(Fe[CN]<sub>6</sub>), 3 mM NaSO<sub>3</sub> und 3,3 mM AMP in 50 mM Tris pH 7,5. Die abiotische Reduktion des K<sub>3</sub>(Fe[CN]<sub>6</sub>) durch Sulfit wurde bestimmt, und danach wurde die Enzymreaktion durch Zugabe des Enzymextraktes gestartet. Eine Einheit (U) wurde als 1  $\mu\text{mol}$  APS (gebildet aus AMP) pro Minute definiert.

Dissimilatorische Sulfitreduktase wurde unter strikt anoxischen Bedingungen als Sulfit-abhängige Oxidation von Methylviologen bestimmt (Dahl & Trüper 2001). Der Reaktionsansatz (1 ml Gesamtvolumen) enthielt Methylviologen (2 mM) in MOPS KOH (pH 7). Methylviologen wurde mit Dithionit (Frederiksen & Finster 2003) oder mit Ti(III) reduziert. Da eine Sulfit-unabhängige Extrakt-abhängige Oxidation des Methylviologen auftrat, wurde der Extrakt in den Küvetten mit Puffer und reduziertem Methylviologen für 30-60 Minuten bei 8°C in der Anaerobenbox vorinkubiert. Die Enzymreaktion wurde durch die Zugabe von 10 mM Sulfit gestartet und die Absorption des Methylviologen ( $\epsilon_{578} = 9,7 \text{ cm}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ ; Zeikus et al. 1977) wurde über die Zeit verfolgt. Eine Einheit (U) wurde definiert als 1  $\mu\text{mol}$  reduziertes Sulfit pro Minute.

Tris-HCl (pH 7,5) konnte in allen Assays alternativ zu MOPS-KOH (pH 7) als Puffer verwendet werden, ohne dass es eine Abweichung in den spezifischen Aktivitäten gab.

Die Messung der Aktivität von Hydrogenase, CO-Dehydrogenase und Formiat-Dehydrogenase erfolgte unter strikt anoxischen Bedingungen (Schauder et al. 1986) mit 4 mM

Benzylviologen ( $\epsilon_{578} = 8,65 \text{ cm}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ ; Zeikus et al. 1977) statt Methylviologen als Elektronenakzeptor.

### 3.4 Analyse der Cytochrome

Die Cytochrome wurden im Rohextrakt, in der löslichen Fraktion und in der Membranfraktion der mikrobiellen Matten aus dem Schwarzen Meer analysiert. Zur Untersuchung der Membranfraktion wurde das Pellet der Ultrazentrifugation (Abschnitt B.3.1) in MOPS-KOH (pH 7) resuspendiert.

Die Zusammensetzung der Cytochrome in Zellsuspension, Rohextrakt, löslicher Proteinfraction und Membranfraktionen wurde durch Aufnahme von Differenzspektren im UV-VIS (300–800 nm) bestimmt. Dabei wurde das Absorptionsspektrum der an der Luft oxidierten Fraktionen von dem Absorptionsspektrum der mit Dithionit reduzierten Fraktionen abgezogen. Die Abschätzung der Cytochrom-Konzentration wurde anhand der  $\alpha$ -Bande (ca. 550-560 nm) bei einem angenommenen Extinktionskoeffizienten von 32,5 pro mM und cm und einer Cytochromgröße von 9,5 kDa vorgenommen (Seeliger et al. 1998), da keine genauen Werte für die Cytochrome der Schwarzmeermatten bekannt sind. Zudem wurden durch Zugabe von Kohlenmonoxid in den Gasraum der Küvette die CO-Differenzspektren aufgenommen.

Im Polyacrylamid-Gel wurden *c*-Typ Cytochrome durch spezifische Färbung ihrer Hämgruppen sichtbar gemacht (Goodhew et al. 1986; Thomas et al. 1976). Dazu wurden die Proteinfractionen mit Mercaptoethanol-freiem Ladepuffer (40% v/v Glycerol, 60% v/v TrisHCl (pH 8)  $80 \text{ g l}^{-1}$  SDS,  $25 \text{ g l}^{-1}$  Dithioerythrol,  $0,04 \text{ g l}^{-1}$  Bromphenolblau) in die Geltaschen gegeben. Nach dem Lauf wurde das Gel in 1,25% Tetramethylbenzidin in 30% Methanol und 250 mM Natriumacetat (pH 5) für 15 Minuten dunkel inkubiert. Durch die Zugabe von  $40 \text{ } \mu\text{l}$  35%  $\text{H}_2\text{O}_2$  wurde die Reaktion der Hämperoxidase gestartet. Nach weiteren 15 Minuten wurden die Gele zweimal in 30% Isopropanol in 250 mM Natriumacetatpuffer (pH 5) gewaschen, und nach den blau-grün erscheinenden Banden der Häm-haltigen Proteine untersucht.

## 4. Molekularbiologische Methoden

### 4.1 DNA-Extraktion

Genomische DNA aus den mikrobiellen Matten wurde nach dem “genomic tip protocol” (Genomic DNA handbook, Qiagen, Hilden, Deutschland) extrahiert. Die DNA-Konzentration

und -reinheit wurde photometrisch anhand der Absorption bei 260 nm ( $A_{260}$ ) und des Verhältnisses  $A_{260}/A_{280}$  ermittelt.

Für die DNA-Extraktion wurden 5-10 ml aus gewachsenen Kulturen ( $> 10^{10}$  Zellen) von SRB verwendet. *Desulfovibrio salexigens* DSM 2638<sup>T</sup> wurde von Dennis Enning zur Verfügung gestellt, *Desulfosarcina cetonica* DSM 7267<sup>T</sup> von Alexander Galushko, *Desulfosarcina ovata* DSM 13228<sup>T</sup> (Stamm oXyS1), *Desulfobotulus sapovorans* DSM 2055<sup>T</sup>, *Desulfobacterium vacuolatum* DSM 3385<sup>T</sup>, *Desulfobacterium niacini* DSM 2650<sup>T</sup>, *Desulfobacterium autotrophicum* HRM2 DSM 3382<sup>T</sup>, *Desulfobacula toluolica* DSM 7467<sup>T</sup>, *Desulfobacter postgatei* DSM 2034<sup>T</sup>, *Desulfonema magnum* DSM 2077<sup>T</sup> und *Desulfonema limicola* DSM 2076<sup>T</sup> von Daniela Lange.

### 4.2 Amplifikation von DNA-Fragmenten

Die Gene für die 16S rRNA sowie für die ATP-Sulfurylase (*sat*) und die APS-Reduktase (*aprBA*) wurden mittels Polymerase Kettenreaktion (PCR) amplifiziert. Jeder PCR-Ansatz enthielt Reaktionspuffer (50 mM KCl und 1,5 mM MgCl<sub>2</sub> in 10 mM TrisHCl pH 8,3), 0,1 mg BSA, 0,2 mM dNTPs, 0,05 mM jedes Primers und 1-2 U taq Polymerase. Die Amplifikation erfolgte in 30 Zyklen à: 45 s bei 94°C (Aufschmelzen der DNA), 45 s bei 45–58°C (Anlagerung der Primer) und 90–150 s bei 72°C (Elongation).

Für die Amplifikation der Gene der bakteriellen und der archaellen 16S rRNA wurden die universellen Primerpaare GM3F/GM4R und ARCH21F/ARCH915R (Primer-Anlagerung bei 48°C) verwendet (DeLong 1992; Muyzer et al. 1995).

Zur Amplifikation des *sat*-Genes aus SRB wurden die degenerierten Primer Sat-19F und Sat-1059R neu entwickelt (Tabelle 2). Die optimale Anlagerungstemperatur für die Primer lag bei 53°C. Zur Sequenzierung wurde zusätzlich der Primer Sat-647R verwendet.

Zur Amplifikation der *aprBA* Gene, die für die abundante Apr aus den mikrobiellen Matten aus dem Schwarzen Meer kodieren, wurde auf der Grundlage der N-terminalen Aminosäuresequenz der degenerierte Primer BS-AprB-1-F entwickelt und in Kombination mit den Primern AprA-5-RV und AprA-10RV (Meyer & Küver 2007) eingesetzt. In Kombination mit letzterem Primer konnte eine fast vollständige Abdeckung der Gene beider Untereinheiten (*aprBA*) erzielt werden. Die optimale Anlagerungstemperatur für die Primer lag bei 53°C. Vor der Klonierung oder Sequenzierungsreaktion wurden die PCR-Produkte mit dem Qiaquick PCR Purification Kit (Qiagen) oder mittels Sephadex G-50 Superfine (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) gereinigt.

**Tabelle 2.** Neu entwickelte Primer zur Amplifikation von *sat* und *aprBA*.

	Sequenz (5' → 3' )	Primer-Bindestelle*
Sat-19F	CCI CAY GGI GGI AAR GG	19 – 35
Sat-647R	TGC ATK GGR TTD CKV AGC TGC A	626 – 647
Sat-1059R	GCA GTA GAA GGT CCA RTC	1042 – 1059
BS-AprB-1-F	ATG CCD AGT TAT GTH ATH AC	1 – 20

\*Position der entsprechenden Nucleotide im *sat* Gen bzw. im *aprB* Gen von *Desulfovibrio desulfuricans* Stamm G20 (GenBank accession no. 3757276 bzw. 3755420)

### 4.3 Klonierung und Transformation

Die Klonierung der PCR Produkte (*aprBA* und 16S rRNA Gene) in den TOPO pCR4 Vektor (TOPO TA Cloning Kit, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland), die Transformation in *Escherichia coli* TOP10 und das Screening der Inserts wurden nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Plasmid-DNA wurde mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) extrahiert. *AprBA* wurde dann direkt aus der gereinigten Plasmid-DNA sequenziert.

### 4.4 Sequenzierung und Sequenzanalyse

Als Template für Sequenzierungsreaktionen dienten gereinigte PCR-Produkte, zum Teil aus dem Screening der Klone, oder extrahierte Plasmid-DNA (s.o.). Die Sequenzierung wurden mit dem ABI BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) vorgenommen. Die Auftrennung und Detektion der DNA-Fragmente erfolgte auf einem ABI Prism 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Die *sat*-Sequenzen aus den Reinkulturen der SRB wurden nicht subkloniert. Daher musste auf der Grundlage der Sequenz, die mit den Primern Sat-19F und Sat-1059R ermittelt wurde, für jeden Stamm nochmals ein interner Primer entwickelt werden, um die 1040 Nucleotide lange *sat*-Teilsequenz zu vervollständigen.

Eine Analyse der DNA- und Proteinsequenzen wurde zunächst mit Hilfe des Lasergene Software Paket (DNASTar, GATC Biotech, Konstanz, Deutschland) oder dem Bioedit sequence alignment editor, Version 7.0.9.0 (Hall 1999) durchgeführt. Eine erste Einordnung der Sequenzen wurde mit dem Basic Local Alignment Search Tool ([www.ncbi.com](http://www.ncbi.com)) vorgenommen.

Zum Vergleich der N-terminalen Aminosäuresequenzen (Abb. 20) wurden verwendet: (**Sat**) *Desulfatibacillum alkenivorans* Stamm AK-01 (ZP\_02131628.1), *Desulfococcus oleovorans* Stamm HxD3 (ABW66812.1), *Desulfobacterium autotrophicum* Stamm HRM2 (YP\_002604365), *Desulfovibrio desulfuricans* Stamm G20 (YP\_388757.1),

*Desulfotomaculum reducens* Stamm MI-1 (ABO49175.1), *Archaeoglobus fulgidus* (AAB89581.1). (**AprB**) *Desulfatibacillum alkenivorans* Stamm AK-01 (YP\_002430736), *Desulfococcus oleovorans* Stamm HxD3 (YP\_001528884), *Desulfobacterium autotrophicum* Stamm HRM2 (YP\_002601731), *Desulfovibrio desulfuricans* Stamm G20 (YP\_387605), *Desulfotomaculum reducens* Stamm MI-1 (YP\_001112001), *Archaeoglobus fulgidus* (NP\_070497). (**DsrA**) *Desulfatibacillum alkenivorans* Stamm AK-01 (YP\_002433449.1), *Desulfococcus oleovorans* Stamm HxD3 (ABW68472.1), *Desulfobacterium autotrophicum* Stamm HRM2 (YP\_002605460.1), *Desulfovibrio desulfuricans* Stamm G20 (ABB37327.1), *Desulfotomaculum reducens* Stamm MI-1 (YP\_001114514.1), *Archaeoglobus fulgidus* (NP\_069259.1). (**DsrB**) *Desulfatibacillum alkenivorans* Stamm AK-01 (YP\_002433448.1), *Desulfococcus oleovorans* Stamm HxD3 (YP\_001530550.1), *Desulfobacterium autotrophicum* Stamm HRM2 (ACN17295.1), *Desulfovibrio desulfuricans* Stamm G20 (ABB37328.1), *Desulfotomaculum reducens* Stamm MI-1 (YP\_001114513.1), *Archaeoglobus fulgidus* (NP\_069260.1).

Phylogenetische Stammbäume wurden mit dem PhyML Programm (Maximum Likelihood Methode, <http://atgc.lirmm.fr/phyml>, 100 bootstraps) erstellt wie zuvor beschrieben (Meyer & Küver 2007).

#### 4.5 Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (FISH)

Homogenisierte Schwarzmeermatten oder Sedimentproben wurden in 2% Formaldehyd in PBS (phosphate buffered saline, 7 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 3 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 130 mM NaCl) über Nacht bei 8°C fixiert und auf 0.2-µm Polycarbonatfilter (GTTP, Millipore, Eschborn, Deutschland) aufgebracht. Die Filter wurden mit PBS gewaschen und anschließend bis zur Analyse bei -20°C aufbewahrt.

Die Hybridisierung, Färbung mit 4',6'-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) und Mikroskopie wurde durchgeführt wie in Amann et al. (1995) beschrieben. Es wurden folgende Sonden verwendet: für die Negativkontrolle NON338, 10% Formamid (FA) (Wallner et al. 1993); für Archaea ARCH915, 35% FA (Amann et al. 1990); für Eubacteria EUBI-III, 35% FA (Daims et al. 1999); für *Desulfosarcina* / *Desulfococcus* DSS658, 50% FA (Manz et al. 1998); für ANME-1 ANME-1 350, 40% FA (Boetius et al. 2000b); für ANME-2 ANME-2 538, 50% FA (Treude et al. 2005). Cy3- oder Carboxyfluorescein- (FLUOS-) markierte Sonden wurden von ThermoHybaid (Ulm, Deutschland) erworben.

## 5. Thermodynamische Berechnungen

Zur Berechnung der Gibbs-Energie unter Standardbedingungen bei einem pH-Wert von 7 ( $\Delta G^\circ$ ) wurden die Werte der freien Enthalpie zur Bildung ( $\Delta G_f^\circ$ ) aus Thauer et al. (1977) bzw. aus Kamyshny et al. (2004, für Polysulfide) entnommen. Für Gase wurde der Wert für den gasförmigen Zustand ( $g$ ) zu Grunde gelegt und mit Atmosphären (atm) gerechnet. Die Änderung der (molaren) Gibbs-Energie (in  $\text{kJ mol}^{-1}$ ) wurde unter der Annahme eines isobaren und isothermen Prozesses für die Inkubationsbedingungen berechnet (Gl. 12).

$$\Delta G = \Delta G^\circ + R T \ln \prod a_i^{\nu_i} \quad (12)$$

Dabei gehen die molare Gaskonstante  $R$  ( $8,314 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ ), die Temperatur  $T$  in Kelvin und das Produkt  $\prod$  der chemische Aktivitäten  $a$  der Reaktanten, die zuvor mit ihrem stöchiometrischen Koeffizienten  $\nu$  multipliziert wurden, in die Reaktionsgleichung ein. Der stöchiometrische Koeffizient  $\nu$  ist positiv für Produkte der Reaktion, negativ für Edukte (Amend & Shock 2001). Die Aktivität der Reaktanten  $a$  ist abhängig von deren Konzentration  $c$  und einem empirisch ermittelten Aktivitätskoeffizienten  $\gamma$  (Gl. 13).

$$a_i = \gamma_i \cdot c_i \quad (13)$$

Den Berechnungen wurden Aktivitätskoeffizienten  $\gamma$  (in Meerwasser) von 0,5 für  $\text{HS}^-$  und  $\text{HCO}_3^-$ ; 0,1 für  $\text{SO}_4^{2-}$  (Nauhaus et al. 2002) zugrunde gelegt. Für weitere Moleküle wurde der Aktivitätskoeffizient unter Verwendung der Davies-Gleichung abgeschätzt (Kamyshny et al. 2004) (Gl. 14, mit Ionenladung  $z_i$  und Ionenstärke  $I$ ):

$$\log \gamma = -0,5 z_i^2 \left( \frac{\sqrt{I}}{1 + 1,5\sqrt{I}} - 0,2 \cdot I \right) \quad (14)$$

Für einfach geladene Moleküle (Acetat, Formiat) betrug der berechnete Aktivitätskoeffizient 0,94 (bei Ionenstärke  $I = 0,72$ ). Da dieser Wert für den Aktivitätskoeffizienten für  $\text{HSS}^-$  im Vergleich zum dem Wert für Sulfid als zu hoch erscheint, wurde aufgrund der Strukturähnlichkeit zu Sulfid ein geschätzter Wert von 0,5 für das Disulfid  $\text{HSS}^-$  angenommen. Der Zusammenhang zwischen Gibbs-Energie und Redoxpotentialdifferenz  $\Delta E$  ist über die Faraday-Konstante  $F$  ( $96.485 \text{ C mol}^{-1}$ ) und die Anzahl der übertragenen Elektronen  $z$  gegeben (Gl.15).

$$\Delta G = -z \cdot F \Delta E \quad (15)$$



Redoxpotentialdifferenzen  $\Delta E$  wurden zudem mit Hilfe der Nernst-Gleichung (Gl. 16) berechnet, die die Aktivitäten der oxidierten und reduzierten Form der Reaktanten berücksichtigt.

$$\Delta E = \Delta E^\circ + \frac{R \cdot T}{z \cdot F} \cdot \ln\left(\frac{a_{ox}}{a_{red}}\right) \quad (16)$$

Differenzen der Standardredoxpotentiale  $\Delta E^\circ$  wurden aus den freien Enthalpien zur Bildung ( $\Delta G_f^\circ$ ) oder aus den Standardredoxpotentialen  $E^\circ$  berechnet.

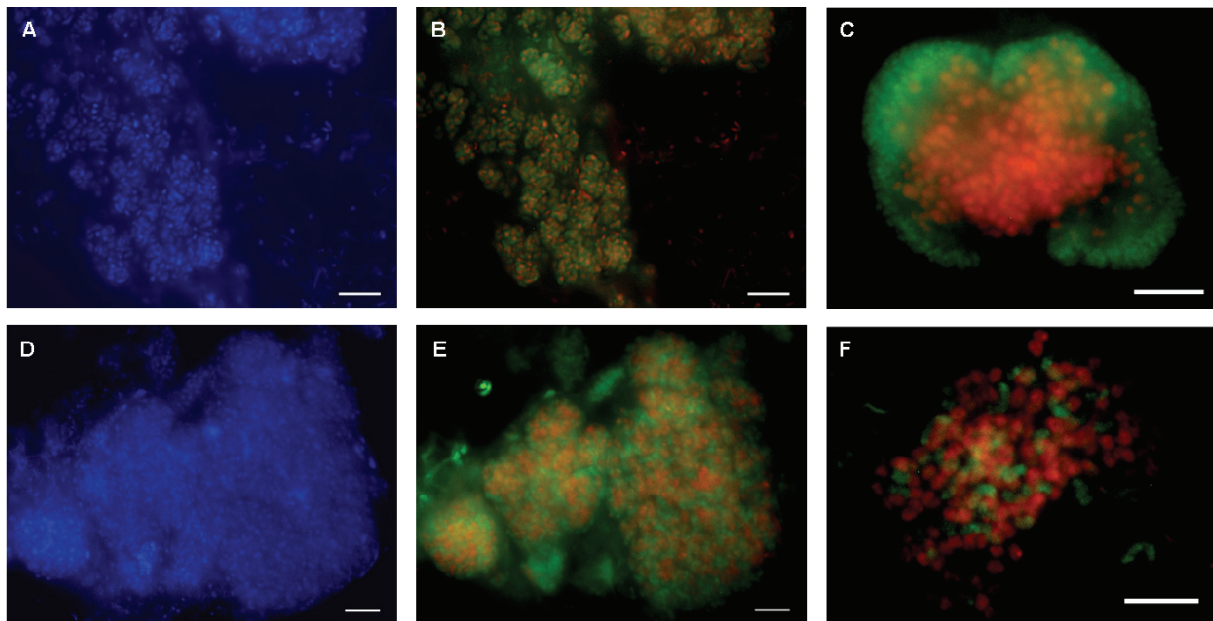
## **C Ergebnisse und Diskussion**

### **1. Abundante Enzyme für die Sulfatreduktion in mikrobiellen Matten aus dem Schwarzen Meer**

Weder von Vertretern der ANME-Gruppen noch von den assoziierten SRB existieren Reinkulturen. Daher wurden biochemische und metagenomische Untersuchungen bisher mit mikrobiellen Matten aus dem Schwarzen Meer, einer natürlichen Anreicherung der Konsortien, durchgeführt. Die Identifizierung der abundanten Methyl-Coenzym M-Reduktase (Mcr) aus diesen mikrobiellen Matten legt nahe, dass ANME das Methan in einer Umkehrung der Methanbildung aktivieren (Krüger et al. 2003). Im Gegensatz dazu ist die Biochemie der an AOM gekoppelten Sulfatreduktion noch nicht untersucht. Es ist ungeklärt, ob diese über den bekannten Weg, d.h. über die Enzyme ATP-Sulfurylase (Sat), APS-Reduktase (Apr) und dissimilatorische Sulfitreduktase (Dsr) verläuft, oder ob sich, auch angesichts der geringen Gibbs-Energie des Gesamtprozesses, ein neuer Mechanismus entwickelt hat. Zudem ist nicht bekannt, ob ANME oder die assoziierten Bakterien die Sulfatreduktion katalysieren. Um Aufschluss über die Biochemie der AOM-gekoppelten Sulfatreduktion zu erhalten, sollten die abundanten Proteine für die Sulfatreduktion aus den mikrobiellen Matten aus dem Schwarzen Meer identifiziert und charakterisiert werden.

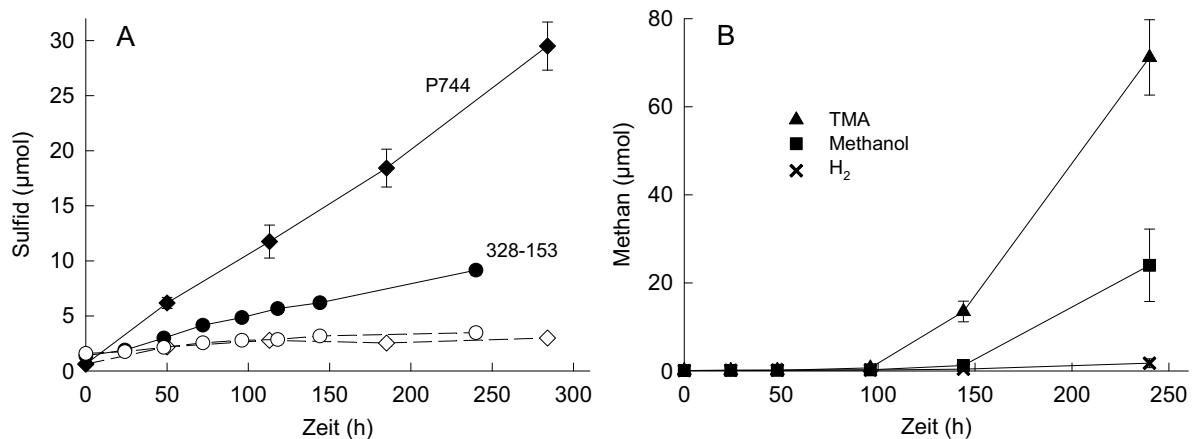
#### **1.1 Charakterisierung der mikrobiellen Matten aus dem Schwarzen Meer**

Die untersuchten mikrobiellen Matten entstammen dem GHOSTDABS-Feld am nordwestlichen Schelf des Schwarzen Meeres, wo sie bis zu vier Meter hohen Karbonatsäulen bedecken (Michaelis et al. 2002). Die Oberfläche der bis zu 10 cm dicken Matten ist schwarz, vermutlich aufgrund von FeS-Präzipitaten. Im Inneren besitzt die Matte eine pink-orange Farbe, die vermutlich auf Cytochrome zurückzuführen ist (Anhang Kapitel 1, Pimenov et al. 1997). Pinker und schwarzer Teil der mikrobiellen Matten unterscheiden sich in der Zusammensetzung der Organismen. Während beobachtet wurde, dass die pinke Matte eine gemischte Aggregation aus ANME-1 und SRB aus der *Desulfosarcina/Desulfococcus*-Gruppe (DSS) darstellt, beherbergt die schwarze Matte hauptsächlich Konsortien aus ANME-2 und DSS (Blumenberg et al. 2004; Krüger et al. 2008; Reitner et al. 2005b).



**Abbildung 11.** Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (FISH) von mikrobiellen Matten aus dem Schwarzen Meer BS P744 (A-C) und BS 328-153 (D-F). Wie für die Inkubationsexperimente (s. Abb. 12) wurden die mikrobiellen Matten nur mechanisch homogenisiert und nicht mit Ultraschall behandelt. Balken 5  $\mu\text{m}$ . (A,D) Ausschnitte aus den mikrobiellen Matten, DAPI-Färbung (B,E) Gleiche Ausschnitte; FISH. Sonde DSS 658 wurde für *Desulfosarcina/Desulfococcus* (grün, FITC), Sonde ANME-2 538 für ANME-2 (rot, Cy3) verwendet (siehe B 4.5). Der Aufbau der mikrobiellen Matte aus ANME/DSS-Konsortien ist erkennbar. (C) Typisches „shell-type“-Konsortium aus ANME-2 und DSS. (F) Gemischtes Konsortium mit nierenförmigen DSS-Zellen, vermutlich durch die Homogenisierung aufgesprengt.

Die mikrobiellen Matten BS P744 und BS 328-153, die bei den proteinbiochemischen Untersuchungen zur Sulfatreduktion verwendet wurden, waren ebenfalls dominiert von Konsortien von ANME-2 und DSS, die etwa 90% der Zellen ausmachten (Abb. 11). Die Organismen und Konsortien in der mikrobiellen Matte waren eingebettet in eine Matrix aus extrazellulären polymere Substanzen (EPS), wie schon für andere mikrobielle Matten aus dem Schwarzen Meer beschrieben wurde (Krüger et al. 2008; Wrede et al. 2008). Interessanterweise wurden keine ANME-1-Zellen beobachtet. In der mikrobiellen Matte BS P744 konnte zudem ein Anteil von 5–10% langer, filamentöser Zellen beobachtet werden. Sie sind in manchen Unterproben der mikrobiellen Matten aus dem Schwarzen Meer zu finden und möglicherweise dem Phylum *Chloroflexi* zuzuordnen (J. Arnds, MPI Bremen, pers. Mitt.). Ihre Funktion in den mikrobiellen Matten ist noch nicht geklärt. Bei der molekularökologischen Analyse ist weiterhin zu berücksichtigen, dass die mikrobiellen Matten zum Zeitpunkt der Analyse und der Experimente bereits mehrere Jahre im Labor bei 8°C mit Methan als einzigem Elektronendonator und Sulfat als Elektronenakzeptor inkubiert worden waren. Ihre Zusammensetzung zum Zeitpunkt der Analyse konnte also von der Zusammensetzung *in situ* abweichen.



**Abbildung 12.** AOM (A) vs. Methanogenese (B) in homogenisierten mikrobiellen Matten aus dem Schwarzen Meer. (A) Sulfidproduktion aus Sulfat von BS P744 (◆) bzw. BS 328-153 (●) mit Methan (2 atm) bzw. ohne Elektronendonator (◇, ○). (B) Methanogenese von BS 328-153 mit 5 mM TMA (▲), 10 mM Methanol (■) oder H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (80/20, v/v, 2 atm) (×). Inkubationen in 20 ml Glasröhrchen (siehe B.1.4): BS P744 (5 mg Trockengewicht) in 10 ml SRB-Medium; Inkubation bei 12°C (MW ±SA; n=3) bzw. BS 328-153 (3 mg Trockengewicht) in 9 ml SRB-Medium; Inkubation bei 22°C (MW ±SA; n=3).

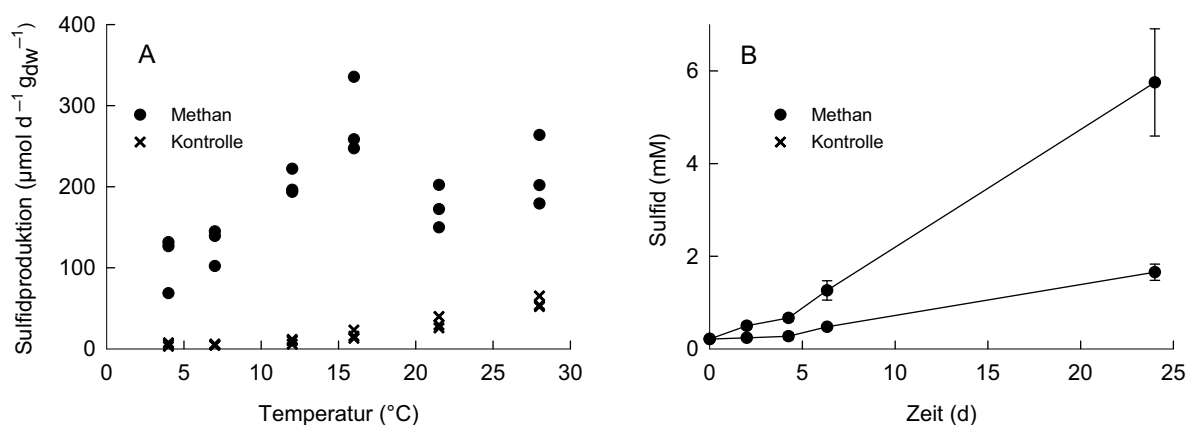
Beide mikrobiellen Matten BS P744 und BS 328-153 produzierten *in vitro* ohne erkennbare *lag*-Phase Sulfid mit Methan als einzigem Elektronendonator (Abb. 12). Es kann davon ausgegangen werden, dass die Rate dieser Sulfidproduktion der AOM-Rate entsprach, da i) AOM und Sulfatreduktion in einem 1:1-Verhältnis gekoppelt sind (Nauhaus et al. 2002), ii) Sulfat der einzige Elektronenakzeptor in der Kultur war und iii) die Rate der Sulfidbildung aus Sulfat ohne Elektronendonator gering war. Die Methan-abhängige Sulfidproduktion war zudem linear, was die Anpassung der mikrobiellen Matten an AOM zeigte. Um zu untersuchen, ob die zuvor unter Methan und Sulfat inkubierten mikrobiellen Matten zusätzlich auch an die Methanogenese adaptiert sind, wurde die Methanbildung mit verschiedenen Elektronendonatoren in kurzen Zeitabständen verfolgt. Die Methanbildung mit Trimethylamin (TMA) bzw. Methanol setzte bei der mikrobiellen Matte BS 328-153 erst nach zwei Tagen ein. Der dann beginnende exponentielle Anstieg der Methankonzentrationen in den Inkubationen deutet auf ein Wachstum von methylotrophen Methanogenen hin, die in der ursprünglichen mikrobiellen Matte nicht abundant waren. Mit H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (80/20 v/v, 2 atm) bzw. 10 mM Acetat wurden innerhalb von 10 Tagen nur sehr geringe Mengen an Methan gebildet. Methanogenese ohne zugesetzte Elektronendonatoren wurde weder bei BS 328-153 noch bei BS P744 beobachtet (Daten nicht gezeigt). Dies zeigt, dass die in dieser Studie verwendeten mikrobiellen Matten nicht *ad hoc* Methanogenese mit Umsatzraten im Bereich der AOM-Raten katalysieren. Auch weitere mikrobielle Matten aus dem Schwarzen Meer mit hohen AOM-Aktivitäten produzierten ohne zugesetzten Elektronendonator in den ersten

Tagen der Inkubation kein Methan. Diese Beobachtungen stehen im Gegensatz zu den Berichten von Seifert et al. (2006), die aus der Änderung des  $\delta^{13}\text{C}$ -Wertes ein Verhältnis von Methanogenese zu AOM von 1:2 ableiteten. Dieses könnte jedoch auf die Rückreaktion der AOM zurückzuführen sein und somit keine Netto-Methanogenese darstellen (Treude et al. 2007, Holler et al. in Vorbereitung). Zudem waren jene Ansätze, in denen Seifert et al. (2006) eine Methanogenese feststellten, über einen längeren Zeitraum inkubiert. Somit könnte die beobachtete Methanbildung auch in Folge des fermentativen Abbaus der mikrobiellen Matte stattgefunden haben.

Die spezifischen Aktivitäten der Methan-abhängigen Sulfatreduktion der mikrobiellen Matten BS P744 bzw. BS 328-153 betragen  $510 \pm 40 \mu\text{mol g}_{\text{dw}}^{-1} \text{d}^{-1}$  bzw.  $230 \pm 30 \mu\text{mol g}_{\text{dw}}^{-1} \text{d}^{-1}$  (Tabelle 1) bei  $12^\circ\text{C}$  bzw.  $22^\circ\text{C}$ . Diese zählen somit zu den höchsten je festgestellten *in vitro* AOM-Raten (Meulepas et al. 2009; Nauhaus et al. 2007). Die für den pinken, ANME-1-dominierten Teil der mikrobiellen Matten festgestellten AOM-Aktivitäten waren im Allgemeinen ein bis zwei Größenordnungen niedriger (Tab.1, Nauhaus et al. 2005). Die höchste Rate der Methan-abhängigen Sulfidproduktion der ANME-2-dominierten mikrobiellen Matte BS 328-153 wurde bei  $16^\circ\text{C}$  festgestellt (Abb. 13A). Diese Beobachtung stellt eine Hypothese von Nauhaus et al. (2005) in Frage. Diese stellten einen Unterschied in den Temperaturoptima der Methan-abhängigen Sulfatreduktion zwischen ANME-2-dominierten Sedimenten vom Hydratrücken ( $8^\circ\text{C}$ ) und ANME-1-dominierten mikrobiellen Matten aus dem Schwarzen Meer ( $16\text{--}24^\circ\text{C}$ ) fest. Daher vermuteten sie, dass diese höheren Temperaturen einen Selektionsvorteil zugunsten von ANME-1 darstellen. Das gleichzeitige Vorkommen von ANME-2 und ANME-1 in unterschiedlichen Teilen derselben mikrobiellen Matte deutet allerdings darauf hin, dass die Temperatur keinen prinzipiellen Selektionsfaktor für ANME-1 gegenüber ANME-2 darstellen kann. Der Grund für das höhere Temperaturoptimum der AOM in den ANME-1- und ANME-2-dominierten mikrobiellen Matten aus dem Schwarzen Meer gegenüber den Sedimenten vom Hydratrücken ist vermutlich die höhere *in situ*-Temperatur, da ein Zusammenhang zwischen dieser und der spezifischen AOM-Aktivität besteht (Krüger et al. 2005). So entsprach das Temperaturoptimum von BS 328-153 in etwa der *in situ*-Temperatur in den mikrobiellen Riffen zum Beprobungszeitpunkt (September/Oktober 2004, T. Treude pers. Mitt.).

Um auszuschließen, dass maßgebliche Sulfatreduktion mit endogenen Elektronendonatoren aus der mikrobiellen Matte, z.B. aus fermentativen Prozessen, stattfand, wurde die Sulfidproduktion aus Sulfat ohne zugesetzten Elektronendonator verfolgt. Diese war unterhalb von  $12^\circ\text{C}$  kaum feststellbar, nahm aber bei steigenden Temperaturen zu, und

betrug bei 28°C etwa ein Viertel der Sulfidproduktion mit Methan (Abb.13B). Vermutlich fand also oberhalb von 12°C fermentativer Abbau der Zellen und der EPS statt, deren Produkte als Elektronendonatoren für die Sulfatreduktion dienten. Die sofortige Sulfidproduktion bei niedrigeren Temperaturen mit Methan als Elektronendonator hingegen zeigt die Anpassung der mikrobiellen Matten an AOM. Beide in den biochemischen Untersuchungen eingesetzten mikrobiellen Matten BS P744 und BS 328-153 sind somit spezifisch an AOM adaptierte Anreicherungen von ANME-2/SRB-Konsortien.



**Abbildung 13.** (A) Temperaturabhängigkeit der Sulfidproduktion in der homogenisierten mikrobiellen Matte BS 328-153 mit 2 atm Methan (●) und ohne Elektronendonator (×). 20 ml Röhrchen waren gefüllt mit 9 ml in SRB-Medium suspendierter mikrobieller Matte (9 mg Trockengewicht). Die spezifischen Raten der Sulfidproduktion (angegeben in µmol Sulfid pro g Trockengewicht und pro Tag) waren über den Inkubationszeitraum von 24 Tagen stabil. (B) Zeitlicher Verlauf der Sulfidkonzentration bei 28°C (MW ± SA; n = 3).

## 1.2 Aktivitäten der Enzyme für die Sulfatreduktion in den mikrobiellen Matten

Um die Biochemie der AOM-gekoppelten Sulfatreduktion in den mikrobiellen Matten aus dem Schwarzen Meer BS P744 und BS 328-153 zu untersuchen, wurde die Aktivität der Enzyme des bekannten Reaktionswegs der Sulfatreduktion, der ATP-Sulfurylase (Sat), der APS-Reduktase (Apr) und der dissimilatorischer Sulfitreduktase (Dsr) mit Hilfe bekannter Assays im zellfreien Extrakt bestimmt (Abschnitt B 3.3). Die Aktivität aller dreier Enzyme konnte nachgewiesen werden (Tabelle 3). Somit ist diese Arbeit eine der wenigen Studien, in denen die Aktivitäten der Enzyme des Sulfatreduktionswegs in Umweltproben gezeigt werden konnten. So wurde Aktivität von Sat und Apr bisher im Proteinextrakt aus *Riftia* spp. und diversen *Bivalvia* gefunden, die in ihrem Gewebe symbiotische chemoautotrophe Sulfidoxidierer beherbergen (Felbeck et al. 1981). Zudem wurde die Aktivität der Sat in einem SRB-enthaltenden Bioreaktor gezeigt, und als enzymatischer Marker für die

Sulfatreduktion in Umweltproben vorgeschlagen (Oyekola & Pletschke 2006; Pletschke et al. 2002).

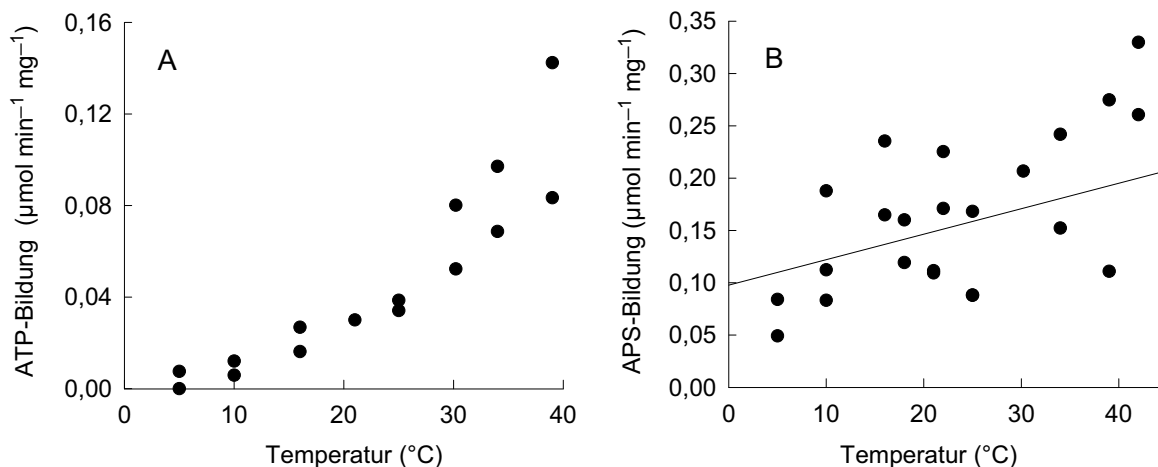
**Tabelle 3.** Spezifische Aktivität der Schlüsselenzyme für die Sulfatreduktion im zellfreien Extrakt von mikrobiellen Matten aus dem Schwarzen Meer (BS) und von Reinkulturen sulfatreduzierender Bakterien.

	Spezifische Aktivität <sup>a</sup> (U mg <sup>-1</sup> )		
	ATP-Sulfurylase (Sat)	APS-Reduktase (Apr)	Sulfitreduktase <sup>b,c</sup> (Dsr)
BS P744	0,10	0,23	n.b.
BS 328-153	0,08	0,27	0,0002
<i>Desulfococcus multivorans</i>	0,38	0,38	n.b.
<i>Desulfosarcina variabilis</i>	0,49	0,90	0,013
<i>Desulfobacterium autotrophicum</i>	0,12	0,85	n.b.

<sup>a</sup> bestimmt bei 28°C, aus jeweils einem zellfreien Extrakt und bezogen auf die Gesamtproteinkonzentration (1 U = 1 µmol min<sup>-1</sup>) <sup>b</sup> n.b. nicht bestimmt <sup>c</sup> Die Aktivität im zellfreien Extrakt der mikrobiellen Matte war vermutlich aufgrund einer Hemmung gering, siehe Text

In Tabelle 3 sind beispielhaft Enzymaktivitäten der Schlüsselenzyme für die Sulfatreduktion aus jeweils einem Zellaufschluß der mikrobiellen Matten BS P744, BS 328-153 und von Reinkulturen von SRB dargestellt. Im zellfreien Extrakt der mikrobiellen Matten BS P744 bzw. BS 328-153 wurden spezifische Aktivitäten der Sat von 0,1 U mg<sup>-1</sup> bzw. 0,08 U mg<sup>-1</sup> und der Apr von 0,23 U mg<sup>-1</sup> bzw. 0,27 U mg<sup>-1</sup> gemessen. Die spezifischen Aktivitäten der Sat und der Apr im Zellextrakt von Reinkulturen sulfatreduzierender Bakterien, die zu Vergleichszwecken bestimmt wurden, waren in der Regel etwa dreimal so hoch. Dies ist darauf zurückzuführen, dass einerseits die Reinkulturen höhere spezifische Sulfatreduktionsraten besitzen, und andererseits die mikrobiellen Matten gemischte Kulturen sind. Diese sind etwa zu gleichen Teilen dominiert von ANME-2 und DSS, und möglicherweise besitzt nur einer der Organismen aktive Enzyme für die Sulfatreduktion. Die spezifischen Aktivitäten der Apr sind mit denen aus Zellextrakten anderer sulfatreduzierender Bakterien (0,2 – 0,5 U mg<sup>-1</sup>) und -Archaeen (0,1 – 1,5 U mg<sup>-1</sup>) vergleichbar (Dahl et al. 1994; Fritz et al. 2000; Krämer & Cypionka 1989; Sperling et al. 1998). Sat war jedoch deutlich weniger aktiv als in den Zellextrakten von *Desulfovibrio* spp. (4 U mg<sup>-1</sup>) und *Archaeoglobus fulgidus* (2 U mg<sup>-1</sup>). Möglicherweise ist die spezifische Aktivität der Sat bei Desulfobacteraceae insgesamt niedriger, da sie auch in den Extrakten der untersuchten Reinkulturen maximal 0,49 U mg<sup>-1</sup> betrug. Auf der anderen Seite ist der enzymatische Test

der Sat empfindlich gegenüber der Aktivität von Pyrophosphatasen. Die Pyrophosphatase-Aktivität im Extrakt der mikrobiellen Matten wurde zwar nicht untersucht, aber es konnte eine Pyrophosphatase im Zellextrakt von BS 328-153 identifiziert werden (Abb. 19). Die spezifische Aktivität der Dsr im zellfreien Extrakt der Schwarzmeermatten war sehr gering verglichen mit den Aktivitäten der anderen beiden Enzyme und den publizierten Werten ( $0,005-0,080 \text{ U mg}^{-1}$ ) für die Dsr in Extrakten von Reinkulturen (Kobayashi et al. 1975; Lee et al. 1973). Andererseits besitzt die Dsr in den Zellextrakten von Sulfatreduzieren eine niedrigere spezifische Aktivität als Sat und Apr. Zudem war die aufsummierte Aktivität der Dsr in den FPLC-Fractionen doppelt so hoch wie im zellfreien Extrakt und fünfmal höher als in der löslichen Proteinfraction (Tabelle 6), so dass die Dsr wahrscheinlich im Extrakt und der löslichen Fraction teilweise inhibiert war. Zur Kontrolle wurde der Assay auch mit dem Zellextrakt von *Desulfosarcina variabilis* durchgeführt. Die bestimmte Dsr-Aktivität von  $13 \text{ mU mg}^{-1}$  lag in der Größenordnung der Aktivitäten in den Extrakten anderer Reinkulturen und etwas niedriger als die des gereinigten Desulforubidins von *D. variabilis* (Arendsen et al. 1993).

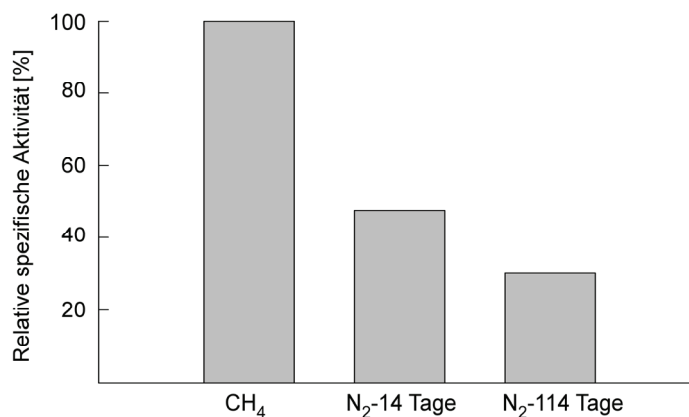


**Abbildung 14.** Temperaturabhängigkeit der spezifischen Aktivität von (A) ATP-Sulfurylase (Sat) und (B) APS-Reduktase (Apr) im zellfreien Extrakt der mikrobiellen Matte BS 328-153 bezogen auf den Gesamtproteingehalt.

Eine interessante Frage ist, ob die Sat, Apr und Dsr aus dem Zellextrakt auch in die Methan-abhängige Sulfatreduktion involviert sind. Dazu wurden die Methan-abhängige Sulfatreduktion (Abb. 13) und die Aktivitäten von Sat und Apr bei  $12^\circ\text{C}$  (Abb. 14) verglichen. Die Methan-abhängige Sulfatreduktion respektive AOM der mikrobiellen Matte BS 328-153 beträgt etwa  $200 \mu\text{mol g}_{\text{dw}}^{-1} \text{ d}^{-1}$ , was bei einem Verhältnis von  $0,28 \text{ g}_{\text{Protein}} \text{ g}_{\text{dw}}^{-1}$  eine



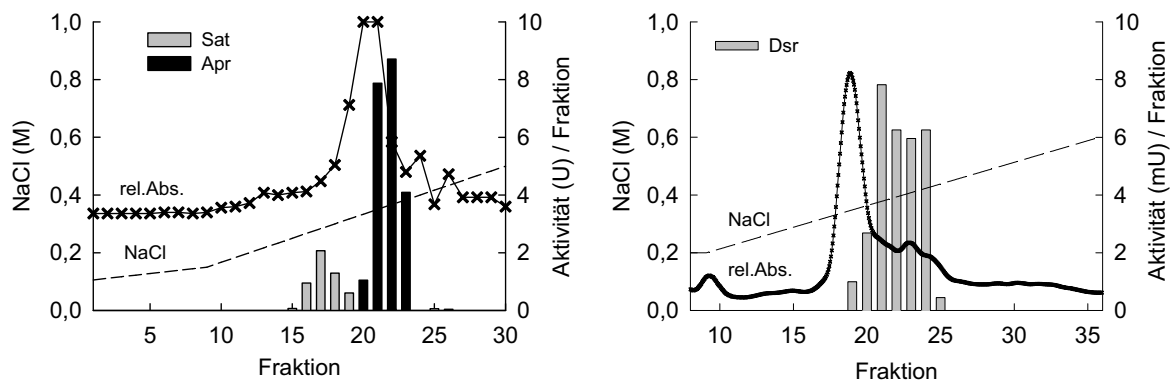
spezifische AOM-Aktivität von  $0,5 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}_{\text{protein}}^{-1}$  bedeutet. Diese spezifische Aktivität von  $0,5 \text{ mU mg}^{-1}$  ( $1 \text{ U} = 1 \text{ } \mu\text{mol min}^{-1}$ ) ist daher etwas höher als die der pinken mikrobiellen Matten ( $0,1 \text{ mU mg}^{-1}$ ; Krüger et al. 2003) und im Bereich der Aktivität, die für eine Methanaktivierung durch revers arbeitende Mcr abgeschätzt wurde (Shima & Thauer 2005). Die spezifischen Aktivitäten der Sat bzw. der Apr betragen etwa  $10 \text{ mU mg}^{-1}$  bzw.  $100 \text{ mU mg}^{-1}$  bei  $12^\circ\text{C}$  (Abb. 14), waren also deutlich höher als die spezifische AOM-Aktivität. Dabei sollte berücksichtigt werden, dass die Enzymtests unter Substratüberschuss und zum Teil mit künstlichen Elektronendonatoren oder -akzeptoren durchgeführt wurden. Daher stellen die gemessenen *in vitro*-Enzymaktivitäten nur potentielle *in vivo*-Enzymaktivitäten dar. So waren auch die spezifischen Aktivitäten der Sat und der Apr bei *Desulfovibrio* spp. höher als die Wachstumsrate (Krämer & Cypionka 1989). Dennoch könnten zumindest Sat und Apr ihren spezifischen Aktivitäten nach die Sulfatreduktion katalysieren, die aus Reduktionsäquivalenten aus der Methanoxidation gespeist wird. Zudem sank die spezifische Aktivität der Sat in der löslichen Proteinfraction um 50% bzw. 70%, wenn die mikrobiellen Matten für 14 bzw. 114 Tage ohne Elektronendonator inkubiert wurden (Abb. 15), was ein weiteres Indiz für die Involvierung der Sat in die Methan-abhängige Sulfatreduktion ist.



**Abbildung 15.** Relative spezifischen Aktivität der ATP-Sulfurylase bei  $28^\circ\text{C}$  im zellfreien Extrakt der mikrobiellen Matte BS 328-153 nach 14 und nach 114 Tagen Inkubation ohne Elektronendonator (MW,  $n = 2$ ) gegenüber der spezifischen Aktivität mit Methan (2 atm) in parallelen Inkubationen ( $n = 4$  bzw.  $n = 3$ ).

### 1.3 Reinigung und Charakterisierung von Sat, Apr und Dsr

Die abundanten Schlüsselenzyme für die Sulfatreduktion wurden über eine Anionen-Austauschchromatographie partiell gereinigt, so dass ihre Untereinheiten über SDS-PAGE und die anschließende Bestimmung ihrer N-terminalen Aminosäuresequenz identifiziert werden konnten (s. B 3.2).



**Abbildung 16.** Links: Elutionsprofil der Aktivitäten von ATP-Sulfurylase (Sat) und APS-Reduktase (Apr) bei der Fraktionierung der löslichen Proteinfraction aus der mikrobiellen Matte BS 328-153 über Anionen-Austausch-Chromatographie (5 ml-Fractionen). Aktivität der Sat (graue Balken) und Apr (schwarze Balken), relative Absorption bei 280 nm (x) sowie NaCl-Konzentration (---). Rechts: Entsprechend das Elutionsprofil der Aktivität der dissimilatorischen Sulfitreduktase (Dsr) in einer separaten Auftrennung des Mattenextraktes über Anionen-Austausch-Chromatographie (4,5 ml-Fractionen).

Bei einer beispielhaften Auftrennung des Zellextraktes der mikrobiellen Matte BS 328-153 wurde die Hauptaktivität der Sat in den Fraktionen 16–19 festgestellt (Abb. 16), die bei einer NaCl-Konzentration von 0,25 – 0,32 M NaCl eluierte. Die Fraktion 19 enthielt bereits die Mcr (Abb. 17). In den Fraktionen 16–18 hingegen machte die Sat sehr wahrscheinlich mehr als 95% des Proteins aus (Tabelle 4, Abb. 17). Da diese Fraktionen 3% des gesamten löslichen Proteins enthielten, war die Sat zudem ein außergewöhnlich abundantes Protein in den mikrobiellen Matten, verglichen mit dem Anteil der Dsr, die aufgrund ihrer geringeren spezifischen Aktivität in der Regel das häufigste Protein der Sulfatreduktion im Zellextrakt von SRB, und deren Anteil am gesamten Zellprotein etwa 2% beträgt (Kobayashi et al. 1975; Seki et al. 1985). Bei der Auftrennung der Proteine aus den Fraktionen 16–18 über SDS-PAGE wurde eine Doppelbande bei etwa 50 kDa festgestellt (Abb. 17), was in etwa der Größe der Oligomere der Sat entsprach (Sperling et al. 1998). Da bei der Reinigung der Sat aus *Archaeoglobus fulgidus* ein Teil des Proteins oder eine der homologen Untereinheiten des Protein abgebaut wurde (Sperling et al. 1998), wurden beide Banden zusammen analysiert. Die ermittelte N-terminale Aminosäuresequenz war homolog zu bekannten ATP-Sulfurylasen (Abb. 20). Die Sequenz war nur in einzelnen Positionen nicht eindeutig, so dass zu vermuten ist, dass die Proteinbande eine Mischung aus sehr ähnlichen ATP-Sulfurylasen darstellte.

**Tabelle 4.** Reinigung der ATP-Sulfurylase (Sat) aus der mikrobiellen Matte BS 328-153

Reinigungsschritt	Volumen (ml)	Protein (mg)	Gesamt-Aktivität <sup>a</sup> (U)	Ausbeute (%)	Spezifische Aktivität (U mg <sup>-1</sup> )
Lösliche Fraktion <sup>b</sup>	17	128	10,10	100	0,08
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> <sup>c</sup>	15	126	n.b.	n.b.	n.b.
Q-Sepharose HP <sup>d</sup>	15	3,8	4,3	43	1,14

<sup>a</sup> bestimmt bei 22°C (1 U = 1 µmol ATP min<sup>-1</sup>) <sup>b</sup> Überstand 150.000 × g, Aktivität im zellfreien Extrakt wurde nicht bestimmt <sup>c</sup> Sulfat (SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>) inhibiert als Endprodukt die ATP-Sulfurylase im Assay (s. B.3.3) <sup>d</sup> Fraktionen 16–18; n.b. nicht bestimmt

Die Hauptaktivität der Apr eluierte bei einer NaCl-Konzentration von 0,33–0,38 M. In der hier dargestellten beispielhaften Reinigung konzentrierte sie sich auf die Fraktionen 20–23 (Abb. 16). Diese enthielten 22 U Apr-Aktivität, was mehr als 80% der auf die Säule gegebenen Aktivität entsprach. Die Fraktionen 20–23 enthielten zudem auch die Mcr, daher wurde die Apr in diesen Fraktionen nicht stark angereichert. Ein 20 kDa großes Protein in diesen Fraktionen war homolog zu der β-Untereinheit bakterieller APS-Reduktasen (Abb. 17 und Abb. 20). Die ca. 70 kDa große α-Untereinheit der Apr (Fritz et al. 2000; Fritz et al. 2002b) konnte vermutlich nicht identifiziert werden, weil sie mit der sehr stark exprimierten, ca. 66 kDa großen α-Untereinheit der Mcr überlappte.

**Tabelle 5.** Reinigung der APS-Reduktase (Apr) aus der mikrobiellen Matte BS 328-153

Reinigungsschritt	Volumen (ml)	Protein (mg)	Gesamt-Aktivität <sup>a</sup> (U)	Ausbeute (%)	Spezifische Aktivität (U mg <sup>-1</sup> )
Lösliche Fraktion <sup>b</sup>	17	128	118	100	0,9
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	15	126	60	50	0,5
Q-Sepharose HP <sup>c</sup>	10	6	13	11	2,2

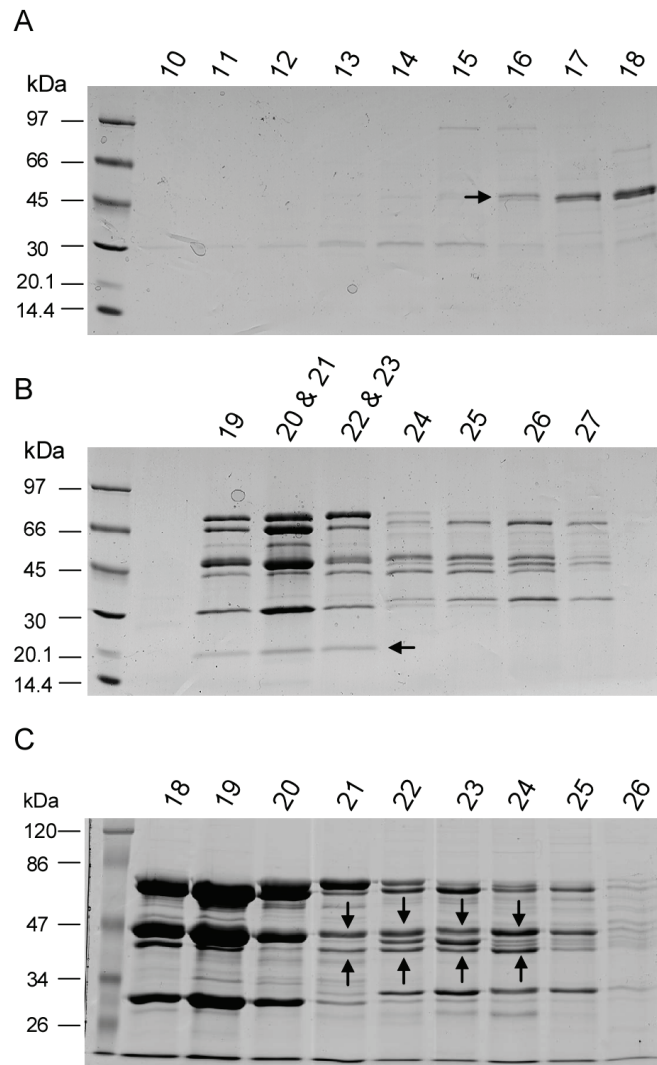
<sup>a</sup> bestimmt bei 22°C (1 U = 1 µmol APS min<sup>-1</sup>) (s. B.3.3) <sup>b</sup> Überstand 150.000 × g, Aktivität im zellfreien Extrakt wurde nicht bestimmt <sup>c</sup> Fraktionen 22–23, enthielten zusätzlich u.a. Mcr

Im Gegensatz zu der Sat und der Apr wurde die Dsr nur aus der Matte BS 328-153 isoliert (Abb.16). In der hier dargestellten, unabhängigen Reinigung wurde Dsr-Aktivität nur in den Fraktionen 19–25 gemessen. Die Dsr eluierte also bei einer etwas höheren NaCl-Konzentration (0,35–0,45 M) als die Apr und die Mcr. Die Fraktionen enthielten Proteinbanden von etwa 47 kDa und 43 kDa, die somit in ihrer Größe der  $\alpha$ - und der  $\beta$ -Untereinheit der bakteriellen Sulfitreduktase (DsrA und DsrB) entsprachen (Abb. 17). Die kleine  $\gamma$ -Untereinheit (DsrC) (Arendsen et al. 1993) wurde nicht gefunden. Da die Fraktionen, in denen sich die Dsr befand, auch z.T. Mcr enthielten, konnte die Dsr-Konzentration im Zellextrakt nicht berechnet werden, die Intensität der Proteinbanden zeigt aber die Abundanz der Dsr in den mikrobiellen Matten (Abb. 17). Von beiden Untereinheiten konnten nur kurze N-terminale Aminosäuresequenzen ermittelt werden, die dennoch hohe Ähnlichkeit zu den N-Termini der bakteriellen DsrA und DsrB zeigten (Abb. 20). Die Sequenzen weisen einige Positionen auf, denen nicht eindeutig eine Aminosäure zuzuordnen ist. Dies könnte man einerseits auf die geringe Qualität der Reinigung und/oder der Sequenzierung zurückführen, andererseits könnten die sequenzierten Banden möglicherweise aus einer Mischung von Sulfitreduktasen aus verschiedenen Deltaproteobakterien bestanden haben.

**Tabelle 6.** Reinigung der dissimilatorischen Sulfitreduktase (Dsr) aus der mikrobiellen Matte BS 328-153

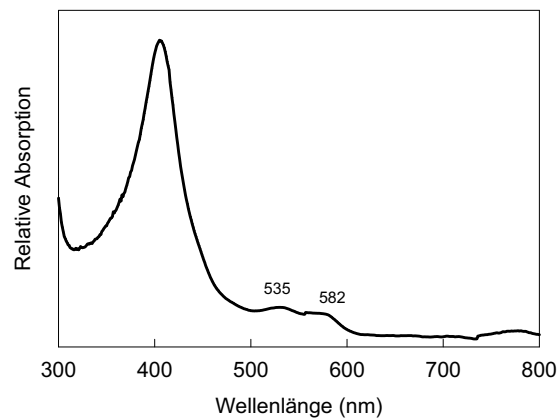
Reinigungsschritt	Volumen (ml)	Protein (mg)	Gesamt-Aktivität <sup>a</sup> (U)	Ausbeute (%)	Spezifische Aktivität (U mg <sup>-1</sup> )
Zellfreier Extrakt <sup>b</sup>	22	98	0,016	100	0,2×10 <sup>-3</sup>
Lösliche Fraktion <sup>c</sup>	17	39	0,006	38	0,2×10 <sup>-3</sup>
Q-Sepharose HP	32	12	0,031	190 <sup>d</sup>	2,5×10 <sup>-3</sup>

<sup>a</sup> bestimmt bei 28°C (1 U = 1  $\mu$ mol Sulfit min<sup>-1</sup>) <sup>b</sup> Überstand 18.000  $\times$  g <sup>c</sup> Überstand 150.000  $\times$  g <sup>d</sup> Dsr-Aktivität im zellfreien Extrakt und in der löslichen Fraktion inhibiert



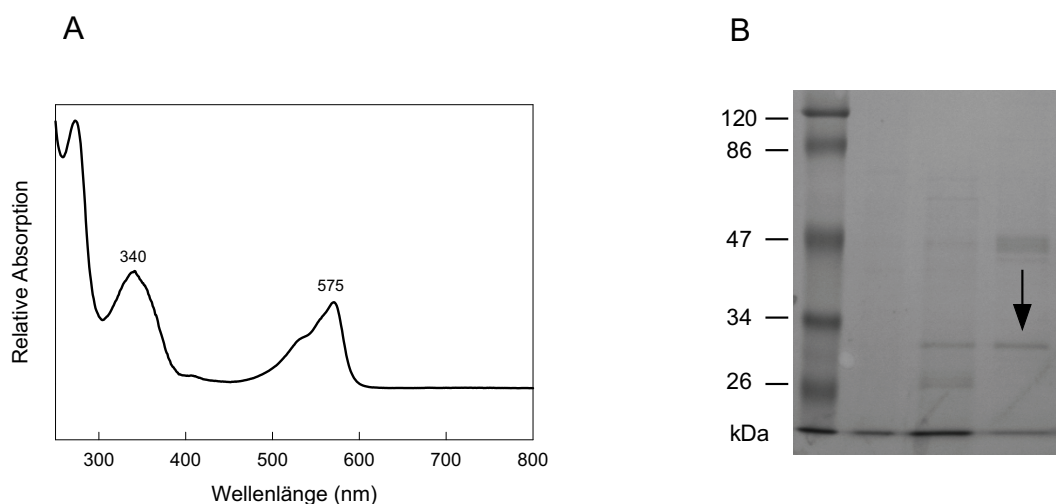
**Abbildung 17.** Auftrennung der Proteine aus den Fraktionen der Anionen-Austausch-Chromatographie der löslichen Fraktion aus BS 328-153 (Abb. 16) mittels SDS-PAGE. (A) ATP-Sulfurylase (Sat, ca. 50 kDa) und (B) APS-Reduktase  $\beta$ -Untereinheit (AprB, ca. 20 kDa). (C) dissimilatorische Sulfitreduktase (DsrA, ca. 47 kDa, DsrB, ca. 43 kDa) aus einer separaten Auftrennung (Abb. 16). In den Fraktionen 19–23 (B) und 18–25 (C) sind zusätzlich die abundanten  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheiten der Mcr zu erkennen, die etwa eine Größe von 66 kDa, 48 kDa und 30–37 kDa besitzen

Das lokale Maximum bei 535 nm sowie eine Schulter bei 582 nm im UV-VIS-Spektrum der Fraktion 24 (Abb. 18) sind ein starkes Indiz für das Vorhandensein eines Sirohäm, des Cofaktors der Dsr. Aufgrund der Maxima könnte dieser aus einer Dsr des Desulforubidin-Typs stammen (Arendsen et al. 1993). Das Maximum bei 406 nm ist wahrscheinlich auf die Absorption von gebundenem Cofaktor  $F_{430}$  in der Mcr zurückzuführen, die mit einem Absorptionsmaximum des Sirohäm bei 398 nm überlappte.



**Abbildung 18.** UV-VIS-Spektrum der Fraktion 24 aus der Anionen-Austausch-Chromatographie (Abb. 16B, Abb. 17), mit einer Schulter bei 582 nm und einem lokalen Maximum bei 535 nm, die auf die Anwesenheit eines Sirohämns hindeuten.

Bei der Fraktionierung der Proteine aus der mikrobiellen Matte BS 328-153 wurde in einer pinken Fraktion der Anionen-Austausch-Chromatographie eine Pyrophosphatase identifiziert, die bei einer NaCl-Konzentration von 0,2 M eluierte (Abb. 19). Die Präsenz einer abundanten Pyrophosphatase ist interessant, da die unter Standardbedingungen endergone Sulfataktivierung durch die ATP-Sulfurylase vermutlich über eine Hydrolyse des entstehenden Diphosphates angetrieben wird (Rabus et al. 2006). Die pinke Farbe der Fraktion ist vermutlich damit zu erklären, dass sich ein Cobalamin-Cofaktor durch die Reinigungsschritte aus einer Methyltransferase gelöst hat.



**Abbildung 19.** (A) UV-VIS-Spektrum des Durchflusses (0,2 M NaCl) der Anionen-Austauschchromatographie der löslichen Proteinfraction aus der mikrobiellen Matte BS 328-153. Mit einer  $\gamma$ -Bande bei 340 nm und einer  $\alpha\beta$ -Doppelbande mit einem Maximum von 575 nm ähnelt es dem von Cobalaminen (Chemaly 2008). (B) Abundante Pyrophosphatase von einer Größe von 30 kDa im Durchfluss.

#### 1.4 Phylogenie der abundanten Enzyme der Sulfatreduktion

Die N-terminalen Aminosäuresequenzen der abundanten Sat und AprB aus der mikrobiellen Matte BS 328-153 (20 Aminosäuren analysiert) sind identisch mit denen aus der mikrobiellen Matte BS P744 (37 und 48 Aminosäuren analysiert, Sequenz nicht vollständig gezeigt) (Abb. 20), was vermuten lässt, dass auch die Gesamtproteine aus beiden Matten sehr ähnlich oder identisch sind. DsrA und DsrB hingegen wurden nur in BS 328-153 untersucht. Die ermittelten Sequenzen der Sat, AprB, DsrA und DsrB wurden mit denen der entsprechenden Enzyme aus den Genomen von sulfatreduzierenden Prokaryoten verglichen (Abb. 19). Insgesamt sind die Aminosäuren der N-Termini von Sat und AprB zu einem hohen Grad konserviert. Dennoch kann man erkennen, besonders offensichtlich bei der Sat und der DsrA, dass die Sequenzen der Enzyme aus den mikrobiellen Matten eine höhere Ähnlichkeit zu denen der Deltaproteobakterien als zu denen des Gram-positiven Sulfatreduzierers *Desulfotomaculum reducens* oder zu denen von *Archaeoglobus fulgidus* besitzen. So beträgt z.B. der Anteil identischer Aminosäuren im Alignment zwischen dem 37 Aminosäuren langen N-Terminus der Sat aus BS P744 und N-Termini der verglichenen ATP-Sulfurylasen aus Deltaproteobakterien 66–73%, während im gleichen Bereich nur 42% bzw. 27% Sequenzidentität zu der Sat aus *D. reducens* bzw. *A. fulgidus* besteht (Daten nicht gezeigt).

Die N-terminale Aminosäuresequenz der gefundene Pyrophosphatase (H<sub>2</sub>N-M?-(A)-V-Y-V-Y-G-?-K-N-P-D-S-?-?-(V)-?-(A)-(A)) weist eine hohe Ähnlichkeit zu der von Pyrophosphatasen aus *Desulfomicrobium baculatum* DSM 4028 (YP\_003156687) und *Desulfovibrio magneticus* RS-1 (YP\_002953957) auf. Über die Phylogenie von Pyrophosphatasen in SRB ist allerdings wenig bekannt, so dass nicht sicher ist, dass das identifizierte Protein von SRB exprimiert wird.

Sat

	10										20															
BS P744	-	-	-	S <sup>N/K</sup>	L	V	P	P	H	G	G	K	G	L	V	X	S	L	L	E	G	S	E	L	22	
BS 328-153	-	-	-	S	K	L	V	A <sup>P</sup>	P	H	G	G	K	G	L	V	X	S	L	L	E	G	S		20	
<i>D. alkenivorans</i>	-	-	M	S	N	L	I	P	P	H	G	G	K	G	L	V	C	C	L	L	E	G	A	E	L	23
<i>D. oleovorans</i>	-	-	M	S	N	L	I	A	P	H	G	G	K	G	L	T	V	C	L	L	E	G	S	E	L	23
<i>D. autotrophicum</i>	-	-	M	S	K	L	V	A	P	H	G	G	K	G	L	V	C	C	K	L	E	G	A	E	L	23
<i>D. desulfuricans</i>	-	-	M	S	N	L	V	P	P	H	G	G	K	G	L	V	C	C	L	L	E	G	A	E	K	23
<i>D. reducens</i>	-	-	-	M	A	L	V	Q	P	H	G	G	K	-	L	T	P	V	L	A	P	K	E	Q	R	21
<i>A. fulgidus</i>	M	P	L	I	K	T	P	P	P	H	G	G	K	L	V	E	R	V	V	K	K	R	D	I	A	25

AprB

	10										20															
BS P744	-	P	S	Y	V	I	T	E	K	C	D	G	C	K	G	G	D	K	T	A	C	M	Y	I	C	24
BS 328-153	-	P	S	Y	V	I	T	E	K	C	D	G	C	K	G	G	D	K	T	A						19
<i>D. alkenivorans</i>	M	P	S	F	V	I	Q	E	K	C	D	G	C	K	G	G	E	K	T	A	C	M	Y	I	C	25
<i>D. oleovorans</i>	M	P	S	F	V	I	A	E	K	C	D	G	C	K	G	G	D	K	T	A	C	M	Y	I	C	25
<i>D. autotrophicum</i>	M	P	S	F	V	I	A	E	K	C	D	G	C	K	G	G	D	K	T	A	C	M	Y	I	C	25
<i>D. desulfuricans</i>	M	P	T	Y	V	D	P	S	K	C	D	G	C	K	G	G	E	K	T	A	C	M	Y	I	C	25
<i>D. reducens</i>	M	P	S	F	V	I	A	E	K	C	D	G	C	K	G	Q	D	K	T	A	C	M	Y	I	C	25
<i>A. fulgidus</i>	M	P	S	F	V	N	P	E	K	C	D	G	C	K	A	L	E	R	T	A	C	E	Y	I	C	25

DsrA

	10										20															
BS 328-153	-	A	G	H	-	E	T	P	Y	S	D	Q	L	E	P <sup>S</sup>	G	<sup>T/F/R</sup> P <sup>F/A</sup>	P	-	-	V					18
<i>D. alkenivorans</i>	M	A	K	H	-	E	T	P	L	L	D	Q	L	E	S	G	P	W	P	S	F	V	S	D	I	24
<i>D. oleovorans</i>	M	A	K	H	-	Q	T	P	L	L	D	Q	L	E	S	G	P	W	P	S	F	V	S	D	L	24
<i>D. autotrophicum</i>	M	A	K	H	-	E	T	P	F	L	D	Q	L	E	S	G	P	W	P	S	F	V	S	D	M	24
<i>D. desulfuricans</i>	M	A	K	H	-	A	T	P	K	L	D	Q	L	E	S	G	P	W	P	S	F	V	S	D	I	24
<i>D. reducens</i>	M	T	E	T	K	K	T	P	L	L	D	E	L	E	K	G	P	W	P	S	F	V	K	E	I	25
<i>A. fulgidus</i>	M	S	E	T	-	-	-	P	L	L	D	E	L	E	K	G	P	W	P	S	F	V	K	E	I	22

DsrB

	10										20															
BS 328-153	-	A	<sup>F/K</sup> P	<sup>S/A</sup> P	K	V	<sup>E/Y</sup> F	<sup>F/N</sup> P	G	K	T	M	K	<sup>S/N</sup> V	I	T	N	I								20
<i>D. alkenivorans</i>	M	A	F	V	S	S	G	Y	N	P	E	K	P	M	E	N	R	I	T	D	I	G	P	K	H	25
<i>D. oleovorans</i>	M	A	F	I	S	S	G	Y	N	P	A	E	P	M	K	D	R	I	T	D	I	G	P	R	S	25
<i>D. autotrophicum</i>	M	A	F	I	S	S	G	Y	N	P	A	K	P	M	E	N	R	I	T	D	I	G	P	K	H	25
<i>D. desulfuricans</i>	M	A	F	I	S	S	G	Y	N	P	E	K	P	M	E	G	R	I	T	D	I	G	P	Q	H	25
<i>D. reducens</i>	M	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Q	A	R	T	D	I	G	P	P	L	12
<i>A. fulgidus</i>	M	-	-	-	-	-	-	-	-	V	M	V	V	E	G	V	K	T	D	F	G	P	P	Y		16

**Abbildung 20.** Vergleiche der N-terminalen Aminosäuresequenz der abundanten ATP-Sulfonylase (Sat), der  $\beta$ -Untereinheit der APS-Reduktase (AprB) sowie der dissimilatorischer Sulfitreduktase (DsrA und DsrB) aus den mikrobiellen Matten aus dem Schwarzen Meer (BS P744 und BS 328-153) mit homologen Proteinen aus sulfatreduzierenden Prokaryoten (*Desulfatibacillum alkenivorans* AK-01, *Desulfococcus oleovorans* Hxd3, *Desulfobacterium autotrophicum* HRM2, *Desulfovibrio desulfuricans* G20, *Desulfotomaculum reducens* MI-1, *Archaeoglobus fulgidus*, s. B 4.4) Vergleichbare N-terminale Aminosäuresequenzen aus *Desulfosarcina* spp. sind nicht bekannt. Aminosäuren identisch zu den N-Termini der mikrobiellen Matten sind durch eine schwarze Box markiert. X nicht identifizierte Aminosäure, - Lücke.



Um die Gensequenz der abundanten Sat aus den mikrobiellen Matten zu ermitteln, wurden auf Basis bekannter *sat*-Sequenzen und des N-Terminus der abundanten Sat degenerierte Primer entwickelt (Abschnitt B.4.2). Mit Hilfe von Kombinationen dieser Primer konnten *sat*-Gene aus den mikrobiellen Matten des Schwarzen Meeres amplifiziert werden, diese waren jenseits des Primerbereiches jedoch nicht identisch mit den Sequenzen des N-Terminus der abundanten Sat. Mit Hilfe der gleichen Primerkombination konnten aber bislang unbekannte *sat*-Sequenzen aus Reinkulturen amplifiziert werden, die phylogenetisch analysiert wurden (Abschnitt F.2.).

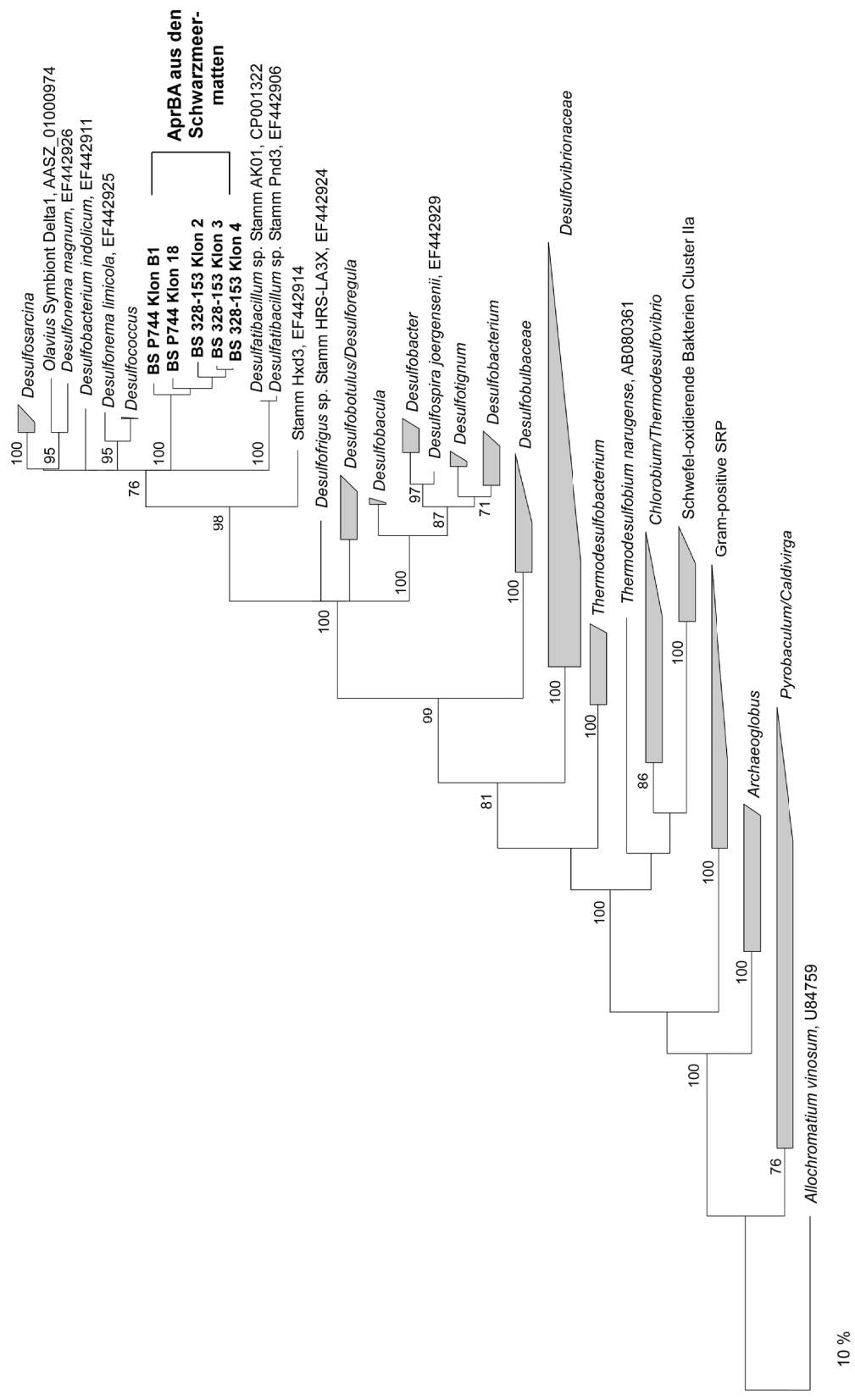
Um die Gensequenz *aprBA* der abundanten Apr aus den mikrobiellen Matten analysieren zu können, wurde ein degenerierter Primer spezifisch für den analysierten N-Terminus der AprB entwickelt. In Kombination mit verschiedenen universellen Primern (Meyer & Küver 2007) wurde dieser degenerierte Primer zur Amplifikation von *aprBA* per PCR verwendet. Mit dem Primerpaar BS-AprB1-F / AprA-10-RV konnte ein 2,35 kB großes Fragment aus BS 328-153 und BS P744 amplifiziert werden. Es entsprach in seiner Größe somit fast der theoretischen Gesamtlänge von *aprBA* in SRB. Aus den Klonbibliotheken konnten insgesamt fünf *aprBA*-Sequenzen ermittelt werden, deren abgeleitete N-terminale Aminosäuresequenz identisch zu den analysierten N-terminalen Aminosäuresequenzen der abundanten AprB aus den mikrobiellen Matten war. Einige weitere Klone trugen *aprBA*-Partialsequenzen, die sich nur geringfügig vom N-Terminus der abundanten Apr unterschieden, was auf eine Mikro-Diversität eng verwandter Sulfatreduzierer in den mikrobiellen Matten hindeutet. Solche eine Mikro-Diversität findet sich interessanterweise auch innerhalb der Gene für die 16S rRNA der ANME-assoziierten DSS (L. Schreiber, pers. Mitt.).

Die aus den fünf *aprBA*-Genen abgeleiteten Aminosäuresequenzen, die im N-terminalen Teil identisch zur abundanten AprB aus den mikrobiellen Matten waren, wurden mit bekannten AprBA aus sulfatreduzierenden Prokaryoten abgeglichen, wobei beide Untereinheiten in einem gemeinsamen Alignment analysiert wurden. Die Topologie des resultierenden phylogenetischen Baumes (Abb. 21) ist der aus früheren Arbeiten bekannten sehr ähnlich (Friedrich 2002; Meyer & Küver 2007). Die *Desulfosarcina/Desulfococcus*-Gruppe wird in sechs separate Abstammungs-Linien eingeteilt, deren Verhältnis zueinander nicht weiter aufgeschlüsselt wird. Dazu gehören (1) *Desulfococcus* spp./*Desulfonema limicola* (2) *Desulfonema magnum/Olavius* Symbiont Delta-1 (3) *Desulfosarcina* spp. (4) *Desulfobacterium indolicum* und (5) *Desulfatibacillum* spp. Zusätzlich bilden die fünf Proteinsequenzen, die im N-Terminus identisch zu der abundanten AprB aus den mikrobiellen

Matten waren, eine neue, separate Abstammungslinie. Interessanterweise ist ihre Position im phylogenetischen Baum sehr ähnlich zu der von SEEP-SRB1, den potentiellen ANME-assoziierten Bakterien, innerhalb des phylogenetischen Baumes des 16S rRNA Gens (Abb.6 und Knittel et al. 2003; Orphan et al. 2001a). Dies ist ein starker Hinweis darauf, dass die abundante Apr aus den mikrobiellen Matten aus den ANME-assoziierten DSS stammt.

Mit dem Ziel, die Zuordnung der Apr zu einem 16S rRNA Gen oder einen anderen phylogenetischen Marker über den genetischen Kontext vorzunehmen, wurden 3000 Fosmid-Vektoren, die 40 kB große Stücke genomischer DNA aus der mikrobiellen Matte BS P744 enthielten, mit den universellen Primern nach *aprBA* untersucht. Es wurden drei *aprBA*-Gene gefunden, von denen keines identisch zum abundanten Apr war. Das heißt, dass die hier verwendeten 3000 Fosmidklone die genetische Diversität der Probe vermutlich nur unzureichend abdeckten. Allerdings wies der N-Terminus der abundanten AprB aus den mikrobiellen Matten etwa 84% Sequenzidentität zu einer den DSS zuzuordnenden *aprBA*-Sequenz aus einer metagenomischen Fosmid-Bibliothek aus genomischer DNA vom Hydratrücken auf (A.Meyerdierks, pers. Mitt.).

## Ergebnisse und Diskussion



**Abbildung 21.** Phylogenetischer Baum der APS-Reduktase (AprBA) (Maximum Likelihood-Methode). Die Sequenzen der abundanten Proteine aus den mikrobiellen Matten aus dem Schwarzen Meer (BS P744 und BS 328-153) sind hervorgehoben. Die Nummern repräsentieren bootstrap-Werte (in %), die Länge des Balken entspricht 10% geschätzte Sequenzabweichung. Erstellt von Jan Kütter.

### **1.5 Ist AOM ein syntropher Prozess? – Aufschlüsse durch die Charakterisierung der abundanten Enzyme für die Sulfatreduktion**

Nach der Mcr, die vermutlich in die Methanaktivierung involviert ist, sind die abundanten Sat, Apr und Dsr offensichtlich die drei häufigsten Proteine der löslichen Fraktion der mikrobiellen Matten. Zudem zeigen zumindest Sat und Apr eine ausreichend hohe Aktivität im Mattenextrakt, um die AOM-Rate erklären zu können. Die mikrobiellen Matten waren vor der Proteinextraktion bei einer Temperatur von 8°C inkubiert worden, bei der die Sulfatreduktionsrate ohne zugesetzten Elektronendonator sehr gering ist. Daher ist es unwahrscheinlich, dass die abundanten Proteine der Sulfatreduktion von SRB exprimiert werden, die z.B. als Kommensalen der ANME vom Abbau der EPS leben; vielmehr ist wahrscheinlich, dass sie unmittelbar Reduktionsäquivalente aus der AOM umsetzen. Ihren N-terminalen Aminosäuresequenzen zufolge sind Sat, AprB, DsrA und DsrB den homologen Enzymen der Deltaproteobakterien zuzuordnen, und nicht denen von *Archaeoglobus* sp. oder denen der gram-positiven Sulfatreduzierer. Die abundante AprBA bildet eine Untergruppe innerhalb der APS-Reduktasen der DSS-Gruppe. Zusammengenommen deuten die Ergebnisse dieser Arbeit daher darauf hin, dass die AOM-gekoppelte Sulfatreduktion zumindest in den untersuchten mikrobiellen Matten aus dem Schwarzen Meer von den assoziierten Bakterien aus der DSS-Gruppe katalysiert wird und daher AOM in diesen Matten eine syntrophe Interaktion von ANME und DSS ist. Einschränkend muss erwähnt werden, dass auf Grundlage der Phylogenie der Enzyme jedoch nicht völlig ausgeschlossen werden kann, dass die Gene für die abundanten Sat, Apr und Dsr über lateralen Gentransfer von Deltaproteobakterien, möglicherweise den assoziierten DSS, zu ANME transferiert wurden, wengleich es bisher keine phylogenetischen Hinweise auf einen lateralen Gentransfer von *aprBA* oder *dsrAB* aus DSS in andere Gruppen gibt.

In einer Folgestudie konnte per Immunolokalisation gezeigt werden, dass Mcr bzw. abundante Sat und Dsr tatsächlich in verschiedenen Zellen exprimiert worden sind (Milučká et al., in Vorbereitung). Zudem konnten Gene für Proteine der dissimilatorischen Sulfatreduktion zumindest im Metagenom von ANME-1 bisher nicht nachgewiesen werden (A.Meyerdierks, pers. Mitt.), während alle Gene der assimilatorischen Sulfatreduktion ANME-1 zugeordnet werden konnten. Ein alternativer Weg der Sulfatreduktion in den Archaeen über Proteine unbekannter Funktion ist letztendlich nicht auszuschließen, es existieren aber keine Hinweise darauf. Eine weitere neue Studie unterstützt die Hypothese der Syntrophie in der AOM. Eine Inkorporation von  $^{13}\text{CO}_2$  in Membranlipide der SRB erfolgte in

Abhängigkeit des Vorhandenseins von Methan (Wegener et al. 2008), was zeigt, dass Wachstum der SRB Methan-abhängig ist. Da ANME offensichtlich das Methan aktivieren, ist es wahrscheinlich, dass ein Transfer von Reduktionsäquivalenten aus der AOM zu den SRB erfolgt.

Reinigungen von Proteinen aus Umweltproben, die man analog der Metaproteomik als „Meta-Biochemie“ bezeichnen könnte, wurden bisher sehr selten durchgeführt. Interessanterweise zählt zu den wenigen Beispielen ebenfalls eine ATP-Sulfurylase, gereinigt aus dem Trophosom des Röhrenwurmes *Riftia pachyptila* (Renosto et al. 1991). Die Reinigung und Charakterisierung der Enzyme des Sulfatreduktionswegs aus den mikrobiellen Matten aus dem Schwarzen Meer verdeutlicht das Potential solcher „meta-biochemischer“ Studien, besonders in Kombination mit der Immunolokalisation der Proteine, zur Aufklärung der Funktion einzelner Phylotypen in mikrobiellen Gemeinschaften.

## **2. Studien zum möglichen extrazellulären Elektronentransfer in der AOM**

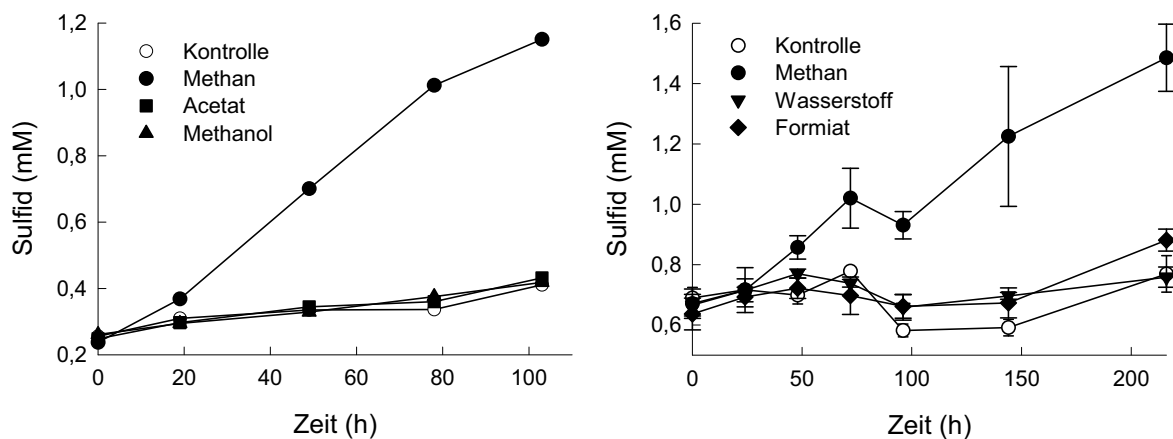
Die Zuordnung der abundanten Proteine für die Sulfatreduktion, isoliert aus den mikrobiellen Matten aus dem Schwarzen Meer zu den assoziierten DSS (Abschnitt C.1) ist ein sehr guter Hinweis darauf, dass AOM eine syntrophe Interaktion von ANME und SRB darstellt. In diesem Fall müssten die SRB Reduktionsäquivalente aus der Methanoxidation von den ANME erhalten. Für diesen potentiellen extrazellulären Elektronentransfer bestehen verschiedene Möglichkeiten (Abb. 7). Im Folgenden werden die vorgeschlagenen Mechanismen des extrazellulären Elektronentransfers in der AOM vor dem Hintergrund neuer Ergebnisse aus dieser Arbeit diskutiert. Zudem werden einige neue Hypothesen vorgestellt, die im Rahmen dieser Arbeit getestet wurden.

### **2.1 Reduzierte Kohlenstoffverbindungen und Wasserstoff als potentielle Intermediate der AOM**

Reduktionsäquivalente könnten über eine reduzierte Kohlenstoffverbindung oder über Wasserstoff von den ANME zu den SRB transferiert werden. Dabei würden ANME Methan entweder vollständig oxidieren und anschließend Protonen zu Wasserstoff reduzieren bzw. CO<sub>2</sub> zu Acetat, Formiat (oder einer anderen Kohlenstoffverbindung). Andererseits könnten sie Methan nur unvollständig oxidieren, z.B. zu Methanol oder Formiat, oder eine Komproportionierung von CO<sub>2</sub> und Methan zu Acetat durchführen. Häufig werden besonders Wasserstoff, Formiat und Acetat als „Intermediat“ in der AOM angenommen bzw. diskutiert, da sie als Überträger von Reduktionsäquivalenten in methanogenen Syntrophien bekannt sind. Zudem sind ANME verwandt zu den *Methanosarcinales*, der Ordnung der methanogenen Archaeen, die ein breites Substratspektrum aufweisen und unter anderem auch Acetat verwerten können. Thermodynamischen Überlegungen zufolge sind Acetat, Methanol und Wasserstoff keine potentiellen Elektronenüberträger in der AOM (Sørensen et al. 2001). Obwohl diese Studie Formiat als Intermediat nicht ausschloß, ist es einer anderen Überlegung zufolge unwahrscheinlich, dass von den ANME gebildetes Formiat der Elektronenüberträger in der AOM ist. Durch die Oxidation der gebundenen Formylgruppe durch die Formylmethanofuran-Dehydrogenase (Fmd) könnten ANME Ferredoxin regenerieren, und so Energie konservieren. Daher erscheint ein Verzicht auf diese Reaktion unwahrscheinlich. In ersten *in vitro*-Experimenten stellten Nauhaus et al. (2002) fest, dass weder Acetat, Wasserstoff, Formiat noch Methanol die Sulfatreduktion in Sedimenten vom Hydratrücken im gleichen Maße wie Methan stimulierten, und daher als Intermediate ausgeschlossen werden

können. In Inkubationen mit mikrobiellen Matten aus dem Schwarzen Meer wurde hingegen eine Wasserstoff und Formiat-abhängige Sulfatreduktion bestimmt, die derjenigen des Methans entsprach (Nauhaus et al. 2005). Die publizierten Daten lassen jedoch nicht den Zeitverlauf der Sulfidproduktion erkennen.

Daher wurden Experimente mit mikrobiellen Matten aus dem Schwarzen Meer durchgeführt, bei denen der Effekt der potentiellen Intermediate bzw. Elektronendonatoren auf die Sulfidproduktion in kurzen Intervallen nach der Zugabe bestimmt wurde. Während eine deutliche Sulfidproduktion mit Methan als Elektronendonator vom ersten Tag an beobachtet wurde, führte die Zugabe von **Acetat, Formiat, Wasserstoff und Methanol** nicht zu einer erhöhten Sulfidproduktion (Abb. 22) gegenüber der Kontrolle ohne zugesetzten Elektronendonator. Der geringe Hintergrund an Sulfidbildung ist dabei vermutlich auf Reduktionsäquivalente aus degradativen Prozessen in den mikrobiellen Matten zurückzuführen (Abschnitt C.1.1).



**Abbildung 22.** Sulfidbildung aus Sulfat (Sulfatreduktion) von mikrobiellen Matten aus dem Schwarzen Meer (BS 328-153) mit verschiedenen potentiellen Intermediaten in der AOM. Sulfatreduktion ohne Elektronendonator (○), mit ca. 3 mM Methan (●), 5 mM Methanol (▲), 5 mM Acetat (■), 1 mM Wasserstoff (▼) und 2 mM Formiat (◆). Die Daten stammen aus zwei verschiedenen Experimenten; linke Seite Inkubation bei 21,5°C (MW; n=2), rechte Seite Inkubation bei 12°C ohne Gasraum (MW ± SA; n = 3).

Das zugesetzte Intermediat bzw. der Elektronenüberträger in der AOM müsste sofort zur Sulfatreduktion führen. Daher können Acetat, Wasserstoff, Formiat und Methanol als solches ausgeschlossen werden, die Ergebnisse unterstützen also den Befund von Nauhaus et al. (2002). Zum gleichen Resultat kommt Meulepas (2009), da Acetat, Wasserstoff, Formiat, Methanol und **Kohlenmonoxid** (CO) die anaerobe Methanoxidation nicht inhibierten, obwohl dies aus thermodynamischen Gründen zu erwarten gewesen wäre. In jener Studie, die mit

einer Anreicherung von ANME-2/DSS-Konsortien aus der Eckernförder Bucht durchgeführt wurde, stimulierte CO (0,05 atm) die Sulfatreduktion. Im Unterschied dazu inhibierte dieselbe Konzentration CO die Sulfidproduktion in den mikrobiellen Matten aus dem Schwarzen Meer (Daten nicht gezeigt). CO übt offensichtlich in dieser Konzentration einen toxischen Effekt auf die Sulfatreduktion aus. Es kann daher für die mikrobiellen Matten nicht ausgeschlossen werden, dass CO in niedrigeren Konzentrationen die Sulfatreduktion stimuliert und möglicherweise das transferierte Intermediat ist. Aus thermodynamischer Sicht ist dies allerdings unwahrscheinlich, da CO ein sehr negatives Redoxpotential besitzt, und damit nur in sehr niedrigen (picomolaren) Konzentrationen als Intermediat gebildet werden könnte.

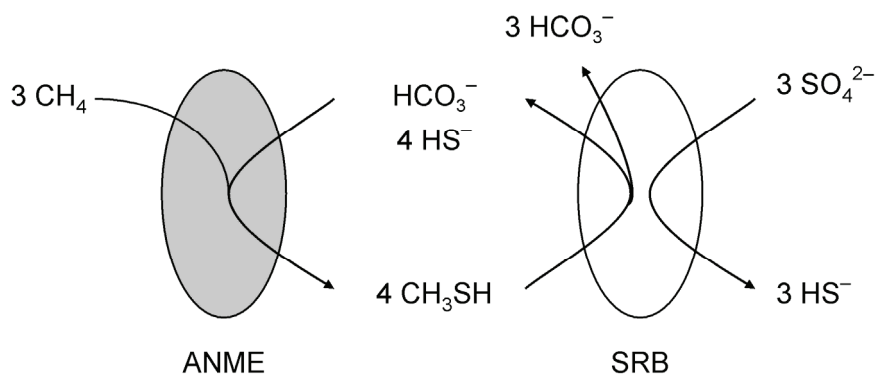
Potentiell könnte auch **Formaldehyd** als Intermediat der AOM freigesetzt werden. Dies ist allerdings schwierig zu testen, da Formaldehyd bereits in niedrigen Konzentrationen toxisch wirkt. Daher wurde den mikrobiellen Matten und AOM-aktivem Sediment vom Hydratrücken **Hexamethylenetetramin** (100  $\mu\text{M}$ ) zugesetzt, das im Gleichgewicht mit Formaldehyd und Ammonium steht. Der Zusatz von Hexamethylenetetramin inhibierte nicht die Methan-abhängige Sulfatreduktion. In Methan-freien Ansätzen führte seine Zugabe nicht zur Sulfidbildung. Statt dessen wurde es äquimolar zu Methan umgesetzt, und Methanogene der Gattung *Methanlobus* wurden angereichert. Daher ist Formaldehyd vermutlich nicht Intermediat der AOM.

Die Kombination von Acetat und Wasserstoff als Elektronenüberträger in der AOM wurde vorgeschlagen (Stams & Plugge 2009; Valentine & Reeburgh 2000), auch Acetat und Formiat oder Wasserstoff in Kombination wären denkbar. In solchen Kombinationen von **multiplen Intermediaten** müssten auch die Verbindungen jeweils einzeln zu einer sofortigen Stimulierung der Sulfatreduktion führen, außer es bestünde eine Abhängigkeit beider/mehrerer Intermediate voneinander. Diese Stimulierung der Sulfatreduktion wurde nicht beobachtet (s.o.). Zudem beeinflussen sich aus thermodynamischer Sicht die niedrigsten Konzentrationen der Intermediate, die gerade noch AOM ermöglichen würden, gegenseitig (nach Gl. 12). Die Zugabe eines der Intermediate im mM-Bereich erlaubte nur niedrigste Konzentrationen der anderen Intermediate, die vermutlich oberhalb der *in situ*-Konzentrationen lägen. Folglich wäre die ausbleibende Hemmung der AOM nach der Zugabe einer einzelnen Verbindung also ein starkes Indiz, dass es auch nicht eines von multiplen Intermediaten ist. Der gemeinsame Zusatz von 1 mM Wasserstoff, 1 mM Acetat und 2 mM Formiat führte zu einer leichten Reduktion, aber nicht zu einer kompletten Inhibierung der AOM nach 4 Tagen (Daten nicht gezeigt), so dass Kombinationen von Acetat, Formiat und Wasserstoff wahrscheinlich nicht den extrazellulären Elektronentransfer vermitteln.

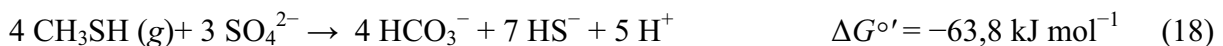


### Methanthiol

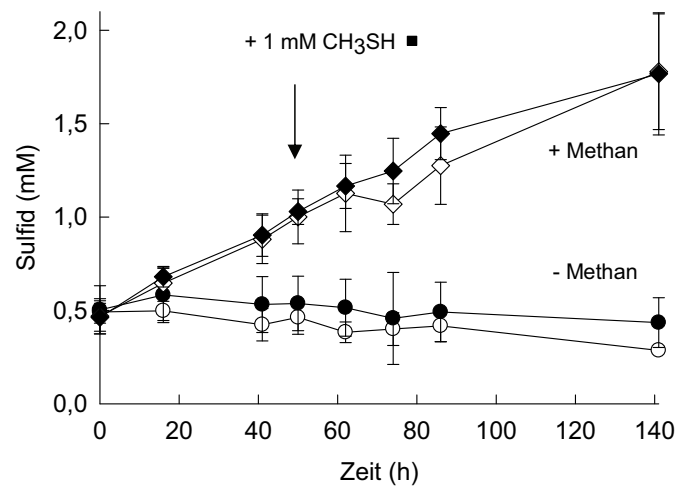
In einer neueren Publikation wurde vorgeschlagen, dass Methanthiol ( $\text{CH}_3\text{SH}$ ) das transferierte Intermediat ist (Moran et al. 2008). Mechanistisch beruht dieses Modell auf einem Methylgruppentransfer von Methyl-Coenzym M auf Sulfid. Stöchiometrisch sind drei der transferierten Methyl-Gruppen aus dem Methan abgeleitet und eine aus dem  $\text{CO}_2/\text{Bicarbonat}$  (Gl. 17). Die SRB oxidierten dann das Methylsulfid (Gl. 18), wobei formal gesehen ein Teil des Sulfids und des  $\text{CO}_2/\text{Bicarbonates}$  wieder zu den ANME zurücktransferiert würde (Abb. 23).



**Abbildung 23.** Methanthiol ( $\text{CH}_3\text{SH}$ ) als Intermediat der AOM (nach Moran et al. 2008).



Als Hinweis auf die Richtigkeit ihrer Hypothese interpretieren die Autoren die partielle Hemmung der AOM in den untersuchten Sedimenten bei Zugabe von 1 mM Methanthiol. Der kurzzeitige Effekt auf die Sulfatreduktion wurde aber nicht untersucht, so dass die Hemmung auch auf eine Toxizität von Methanthiol zurückzuführen sein könnte. Aus thermodynamischer Sicht ist Methanthiol als Intermediat unwahrscheinlich, da bei den *in vitro*-Bedingungen (2 atm  $\text{CH}_4$ , 30 mM  $\text{HCO}_3^-$ , 28 mM  $\text{SO}_4^{2-}$ , 1 mM  $\text{HS}^-$  und pH 7) bereits ca. 0,2 nM die Methanoxidation inhibieren würden. Um dieses Modell zu untersuchen, wurde Methanthiol ebenfalls zu Sediment vom Hydratrücken zugegeben, und der Effekt auf die Sulfatreduktion mit und ohne Methan wurde in kurzen Zeitabständen untersucht.

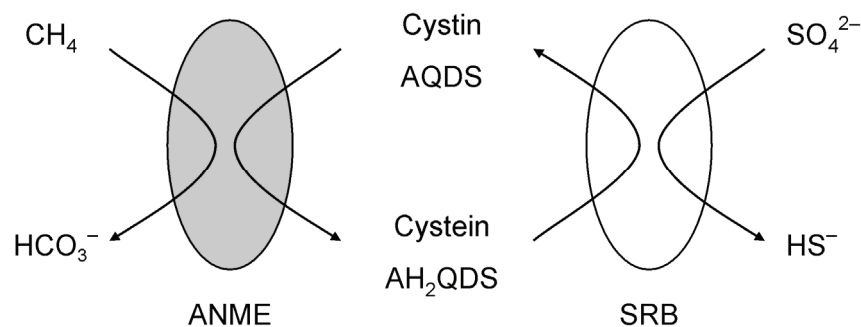


**Abbildung 24.** Sulfidbildung aus Sulfat (Sulfatreduktion) in Sediment vom Hydratrücken (HR 2000) ohne Elektronendonator (○), mit 2 atm Methan (◇) mit 1 mM Methanethiol (●) und mit 1 mM Methanethiol und 2 atm Methan (◆). Der Pfeil deutet den Zeitpunkt der Methanethiol-Zugabe an. Inkubation bei 12°C (MW ± SA; n = 3).

Methanethiol (1 mM) inhibierte die Methan-abhängige Sulfatreduktion in den Sedimentproben vom Hydratrücken nicht, war also in der zugesetzten Konzentration nicht toxisch für die AOM-katalysierenden Organismen (Abb. 24). In parallelen Inkubation wurde keine Stimulation der Sulfidproduktion durch Methanethiol festgestellt, so dass Methanethiol in dem getesteten Sediment vom Hydratrücken, das von ANME-2/DSS dominiert ist (Boetius et al. 2000b), nicht der Elektronendonator für die ANME-assoziierten DSS ist. Ähnliche Effekte wurden in Experimenten mit mikrobiellen Matten aus dem Schwarzen Meer beobachtet (Daten nicht gezeigt). Somit kann zumindest für die mikrobiellen Matten aus dem Schwarzen Meer und für das Sediment vom Hydratrücken ausgeschlossen werden, dass Methanethiol Intermediat der AOM ist.

## 2.2 Potentielle Elektronenüberträger in der AOM

In einer syntrophen Katalyse der AOM könnten Reduktionsäquivalente auch über redox-aktive Überträgermoleküle von ANME zu den SRB transferiert werden (Abb. 25). Im Unterschied zu den möglicherweise aus dem Methan abgeleiteten reduzierten Kohlenstoffverbindungen würden die Überträgermoleküle selbst nicht abgebaut, sondern nur Elektronen zwischen den Zellen übertragen. Sie könnten also in niedrigen Konzentrationen vorkommen, da sie recycelt würden. Redoxaktive Überträger sind aus syntrophen Interaktionen sowie als Mediatoren des extrazellulären Elektronentransports zwischen Zellen und Oberflächen bekannt (Abschnitt A.4.). Ein Überträgersystem, bestehend aus der oxidierten und der reduzierten Form des Überträgermoleküls, vermittelt den Elektronentransfer zwischen einer Reduktion und einer Oxidation, die räumlich voneinander getrennt sind. Daher besitzen solche Überträgersysteme im Idealfall ein Redoxpotential, das zwischen den beiden Halbreaktionen liegt, und die Moleküle selbst sind meistens klein und besitzen daher einen hohen Diffusionskoeffizienten. Die Standardredoxpotentiale der Methanoxidation ( $E^{\circ'} = -244$  mV für  $\text{CO}_2/\text{CH}_4$ ; unter Versuchsbedingungen  $E' = -252$  mV) und der Sulfatreduktion ( $E^{\circ'} = -216$  mV für  $\text{SO}_4^{2-}/\text{HS}^-$ ) erfordern einen Überträger mit einem niedrigem Redoxpotential von etwa  $-230$  mV.

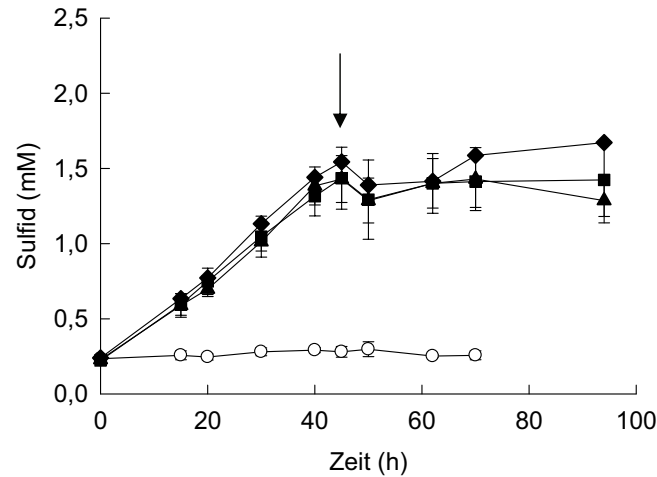


**Abbildung 25.** Extrazellulärer Elektronentransfer über redoxaktive Überträgermoleküle (electron carrier).

### Anthrachinone

Anthrachinone, insbesondere Anthrachinon-2,6-disulfonat (AQDS), sind als Mediatoren des extrazellulären Elektronentransfers bekannt. AQDS wird als Analogon zu Huminstoffen betrachtet, hochmolekulare organische Substanzen, die weit verbreitet und zudem in mikrobiell katalysierte Redoxreaktionen involviert sind (Lovley et al. 1996). Anthrachinone besitzen niedrige Standard-Redoxpotentiale von etwa  $-200$  mV (Van der Zee & Cervantes

2009). Daher wurde getestet, ob die Zugabe niedriger Konzentration von AQDS, Anthrachinon-2-disulfonat (AQS) sowie Anthrachinon-2-carboxylat (AQC) die AOM stimulieren, und sie somit als potentielle Überträger involviert sind.



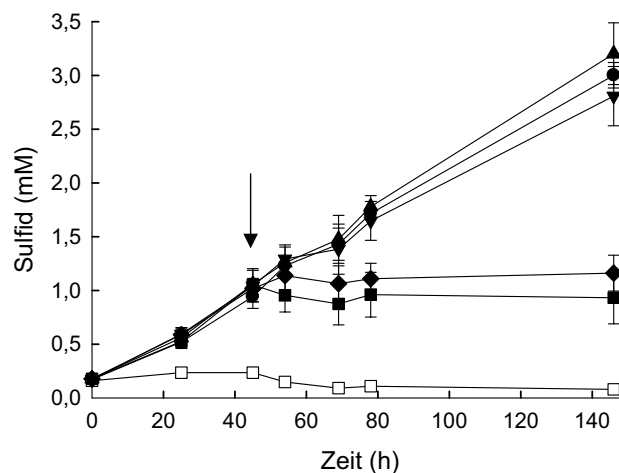
**Abbildung 26.** Effekt von Anthrachinonen auf die Methan-abhängige Reduktion von Sulfat zu Sulfid in mikrobiellen Matten aus dem Schwarzen Meer (P784). Inkubation bei 12°C unter N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (90/10 v/v) (○) bzw. 2 atm Methan (geschlossene Symbole). Der Zeitpunkt der Zugabe von 100 μM Anthrachinon-2-carboxylat (AQC) (■), 100 μM Anthrachinon-2,6-disulfonat (AQDS) (◆) und 100 μM Anthrachinon-2-sulfonat (AQS) (▲) ist durch einen Pfeil gekennzeichnet. MW ±SA (n=3).

Die Zugabe von 100 μM von AQDS, AQS sowie AQC inhibierte sofort die Methan-abhängige Sulfatreduktion in mikrobiellen Matten aus dem Schwarzen Meer (Abb. 26) und Sediment vom Hydratrücken (HR 2000, Daten nicht gezeigt). Diese Hemmung war jedoch reversibel, da nach dem Waschen der Kultur wieder eine Methan-abhängige Sulfatreduktion festgestellt wurde. Der Effekt der Zugabe von AQDS war stark konzentrationsabhängig und trat bei 10 μM noch nicht auf (Abb. 27). In weiteren Experimenten wurde auch eine Hemmung der Methanoxidation bei Zugabe von 100 μM AQDS beobachtet, einen Effekt, den schon Nauhaus et al. (2005) beschrieben. Es ist unwahrscheinlich, dass die Hemmung auf eine Änderung der Redoxbedingungen in den AOM-Inkubationen zurückzuführen ist, da die Anthrachinone reduziert wurden, und das Redoxpotential hauptsächlich durch das Sulfid bestimmt wird.

Eine spezifische Hemmung der AOM wäre allerdings von dem Gesichtspunkt aus interessant, dass sie Aufschluss über beteiligte Reaktion bringen könnte. Darum wurde der Effekt der Zugabe von Anthrachinonen auf Reinkulturen von Sulfatreduzieren und Methanogenen untersucht. AQC und AQS inhibieren die Sulfatreduktion von

*Desulfobacterium autotrophicum* und führen zu einem verzögerten Wachstum von *Methanococcus maripaludis*, 1 mM AQDS hingegen besaß gar keinen Effekt auf das Wachstum des Methanogenen, und inhibierte die Sulfatreduktion von *D. autotrophicum* mit Lactat als Elektronendonator. Die Hemmung der AOM durch Anthrachinone ist also vermutlich nicht spezifisch für AOM. Eine Inhibierung von Methanogenese und Sulfidbildung durch Anthrachinone wurde schon zuvor beschrieben (Kung et al. 1998). Dabei ist die Hemmung der Sulfatreduktion von *Desulfovibrio gigas* bereits durch mikromolare Konzentrationen von Anthrachinonen möglicherweise auf die Entkopplung der ATP-Synthese zurückzuführen (Cooling et al. 1996). Daher besteht vermutlich auch ein Zusammenhang zwischen der Membrangängigkeit und der Toxizität der Moleküle. So weist mit AQC das am stärksten hydrophobe von den drei getesteten Anthrachinonen auch den stärksten Effekt auf die Sulfatreduktion und die Methanogenese auf.

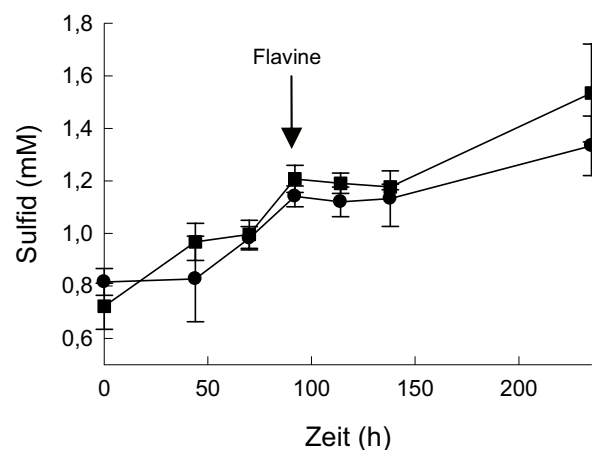
Da bereits die Zugabe geringer Konzentrationen der Anthrachinone AOM inhibierte, ist es schwierig zu untersuchen, ob i) ihre oxidierte Form ein alternativer Elektronenakzeptor für die AOM und ii) ihre reduzierte Form Elektronendonator für die Sulfatreduktion ist. Dennoch erscheint es aufgrund des offensichtlich toxischen Effektes der Anthrachinone unwahrscheinlich, dass sie Elektronenüberträger in der AOM sind.



**Abbildung 27.** Konzentrationsabhängigkeit des Effektes von AQDS auf die Methan-abhängige Reduktion von Sulfat zu Sulfid in mikrobiellen Matten aus dem Schwarzen Meer (P784). Inkubation bei 12°C unter N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (90/10 v/v) bzw. 2 Atmosphären Methan (geschlossene Symbole). Der Pfeil kennzeichnet den Zeitpunkt der Zugabe von 0 (●), 1 (▲), 10 (▼), 100 (◆) und 1000 μM (■) Anthraquinon-2,6-disulfonat (AQDS). Kontrolle ohne Methan (□) mit 1000 μM AQDS. MW ±SA (n=3).

## Flavine

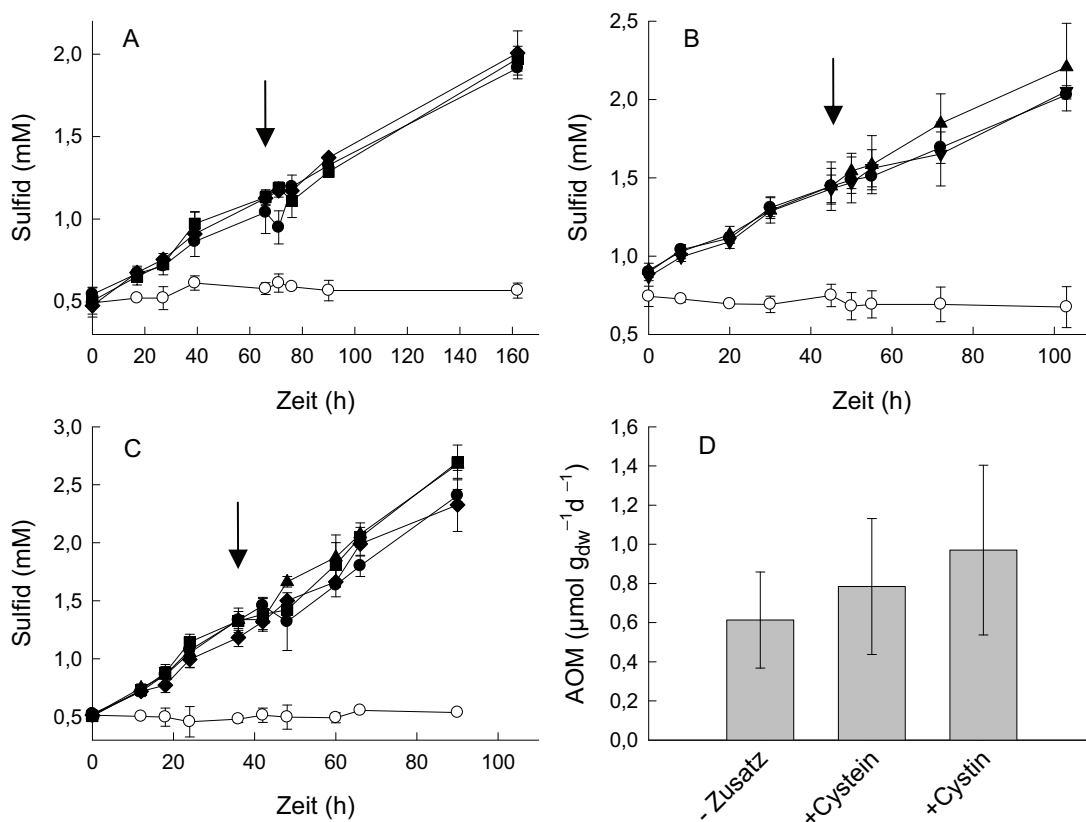
Zwei neuere Studien zeigen, dass *Shewanella* spp. die redox-aktiven Flavine FMN und Riboflavin sekretieren, und diese in den extrazellulären Elektronentransfer zu Elektroden oder zu Fe(III) involviert sind (Marsili et al. 2008; von Canstein et al. 2008). Auch das intrazelluläre FAD kann in niedrigen Konzentrationen (10  $\mu$ M) die Eisenreduktion stimulieren (von Canstein et al. 2008). Alle drei Flavine besitzen sehr negative Standardredoxpotentiale von  $-219$  mV (FAD und FMN) sowie  $-208$  mV (Riboflavin) (Van der Zee & Cervantes 2009). Daher wurde ihr Effekt auf die AOM getestet. Erste Experimente deuteten eine kurzfristige komplette Hemmung der Methan-abhängigen Sulfatreduktion durch 100  $\mu$ M FAD und durch 100  $\mu$ M Riboflavin (Abb. 28) sowie durch 100  $\mu$ M FMN an, die nach zwei Tagen zumindest teilweise wieder aufgehoben war. Über den gesamten Zeitraum des Experimentes wurde auch weniger Methan oxidiert als in der Kontrolle ohne Flavine (Daten nicht gezeigt), was auf eine Hemmung der Methanoxidation hinweist. Auch 5  $\mu$ M Riboflavin inhibierten bereits die Methan-abhängige Sulfatreduktion (T. Holler, pers. Mitt.). Die Hemmung der AOM durch Flavine könnte auf unspezifische Redoxeffekte innerhalb der Zellen zurückzuführen sein. Analog zur Hemmung durch die Anthrachinone kann man aufgrund ihres inhibierenden Effektes eine Rolle der Flavine als Elektronenüberträger in der AOM nicht ausschließen, sie ist aber unwahrscheinlich.



**Abbildung 28.** Effekt von 100  $\mu$ M FAD (■) und 100  $\mu$ M Riboflavin (●) auf die Sulfidbildung aus Sulfat mit Methan (2 atm) in mikrobiellen Matten aus dem Schwarzen Meer BS 328-153 bei 12°C. MW  $\pm$  SA (n = 3).

## Thiole

Thiole sind als Elektronenüberträger in Syntrophien bekannt. So vermitteln Cystein/Cystin den extrazellulären Elektronentransfer in der syntrophen Oxidation von Acetat durch *Desulfuromonas acetoxidans* und *Wollinella succinogenes* (Kaden et al. 2002). Bei der Oxidation zweier Moleküle Cystein wird das Disulfid Cystin gebildet, was mit dem Transfer zweier Elektronen einhergeht. Cystin/Cystein besitzt ein niedriges Standardredoxpotential von  $-345$  mV, das stark konzentrationsabhängig ist, und unter *in vitro*-Bedingungen von  $25$   $\mu$ M Cystin/ $50$   $\mu$ M Cystein ( $E' = -230$  mV) als Elektronenüberträger in der AOM in Frage käme. Daher wurde die Wirkung der Zugabe von Cystein und zweier ähnlicher Thiole mit niedrigen Redoxpotentialen (Rubino et al. 2008), Homocystein ( $E^{\circ'} = -203$  mV) und Cysteamin ( $E^{\circ'} = -220$  mV) auf die AOM untersucht.



**Abbildung 29.** Effekt von Thiolen auf die Methan-abhängige Reduktion von Sulfat zu Sulfid. Inkubation von Sediment vom Hydratrücken HR 2000 (A-B) und Schwarzmeermatten P784 (C) unter 2 Atmosphären Methan (geschlossene Symbole). Der Zeitpunkt der Zugabe von  $100$   $\mu$ M Cystein ( $\blacksquare$ ),  $50$   $\mu$ M Cystin ( $\blacklozenge$ ),  $200$   $\mu$ M D,L-Homocystein ( $\blacktriangle$ ) und  $100$   $\mu$ M Cysteamin ( $\blacktriangledown$ ) ist durch einen Pfeil gekennzeichnet. Kontrolle ohne Methan ( $\circ$ ), Kontrolle ohne Thiol-Zugabe mit Methan (2 atm) ( $\bullet$ ). (D) Effekt der Zugabe von  $100$   $\mu$ M Cystein und  $50$   $\mu$ M Cystin auf die AOM, bestimmt als Bildung von  $^{14}CO_2$  aus  $^{14}CH_4$  in Sediment vom Hydratrücken (HR 2000). MW  $\pm$  SA (n = 3).

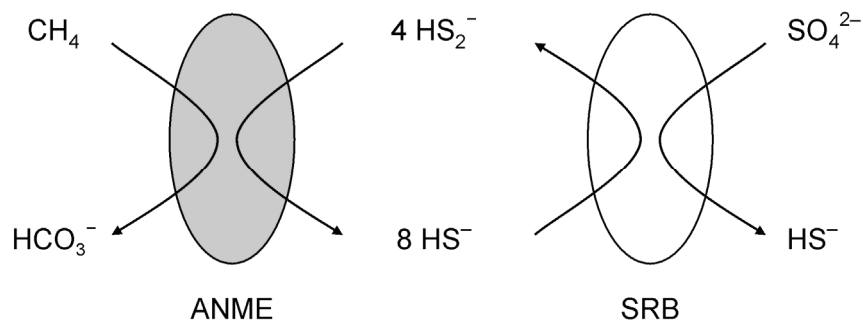
Weder Cystein (100  $\mu\text{M}$ ), Cystin (50  $\mu\text{M}$ ), Cysteamin (100  $\mu\text{M}$ ) noch Homocystein (200  $\mu\text{M}$ ) beeinflussten die Methan-abhängige Sulfatreduktion in mikrobiellen Matten aus dem Schwarzen Meer und in Sediment vom Hydratrücken (HR 2000). Auch die AOM wurde durch die Zugabe niedriger Konzentrationen der Thiole weder inhibiert noch stimuliert (Abb. 29). Weitere Thiole, Dithionit (90  $\mu\text{M}$ ) und Coenzym M (100  $\mu\text{M}$ ) besaßen ebenfalls keinen Effekt auf die Methan-abhängige Sulfatreduktion. Die Thiole könnten dennoch in den extrazellulären Elektronentransfer der AOM involviert sein, wenn die Elektronenübertragung nicht der limitierende Schritt ist, oder sie bereits in ausreichender Konzentration vorhanden sind. Daher wurden die Thiole als Elektronendonatoren für die Sulfatreduktion getestet. In mikrobiellen Matten aus dem Schwarzen Meer inhibieren 1 mM Cystein oder Homocystein nicht die Methan-abhängige Sulfatreduktion und führen gleichzeitig nicht *ad hoc* zu einer gegenüber der Kontrolle erhöhten Sulfatreduktion (Daten nicht gezeigt). Nach 60 Stunden war die Sulfatreduktion nur in den Inkubationen mit Cystein gegenüber der Kontrolle ohne Elektronendonator erhöht, und zeigte einen exponentiellen Verlauf. Aufgrund der hohen Gesamt-Sulfidproduktion kann man vermuten, dass Cystein vermutlich komplett oxidiert wurde. Auch Anreicherungen von Sediment vom Hydratrücken (HR 2000) auf 5 mM Cystein führten innerhalb von einer Woche ebenfalls zu einer Sulfidproduktion, die nicht allein auf die Oxidation der Thiolgruppe zurückzuführen sein konnte, sondern auf eine komplette Oxidation des Cysteins. Parallel wurde auch Cystin komplett oxidiert. Bestätigen sich diese Ergebnisse in weiteren Experimenten, so kann ausgeschlossen werden, dass Cystein/Cystin bzw. Homocystein/Homocystin Elektronenüberträger in der AOM sind.



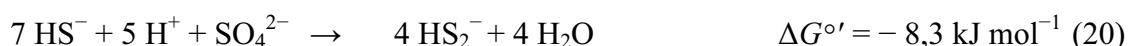
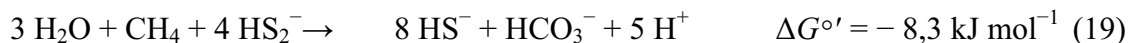
### Extrazellulärer Elektronentransfer über einen Schwefelkreislauf

Das Redoxpaar Sulfid/Schwefel ist von zentraler Bedeutung in den syntrophen Konsortien des Phototrophen *Chlorochromatium* und des Schwefelreduzierers *Desulfuromonas* (Pfennig & Biebl 1976), und vermutlich vermittelt es die Eisenreduktion in anoxischen Habitaten mit niedriger Schwefelkonzentration (Straub & Schink 2004). Letztere Hypothese basiert auf der Eisenreduktion durch *Sulfurospirillum deleyianum* über die intermediäre Reduktion einer oxidierten Schwefelspezies, z.B. Thiosulfat oder elementarem Schwefel, zu Sulfid, welches mit Fe(III) weiterreagiert. Ein interner Schwefelkreislauf konnte inzwischen als Mechanismus der Eisenreduktion von *Pelobacter carbinolicus* (Haveman et al. 2008) sowie der Elektrodenreduktion in mikrobiellen Brennstoffzellen (Dutta et al. 2009) gezeigt werden.

Die mikrobielle Reduktion von  $S^0$  verläuft vermutlich über Polysulfide statt über die Reduktion des unlöslichen elementaren Schwefels (Hedderich et al. 1999; Klimmek et al. 1991). Eine weitere Möglichkeit der extrazellulären Elektronenübertragung von den ANME zu den SRB stellt daher das Sulfid/Polysulfid-Redoxpaar dar (Abb. 30).



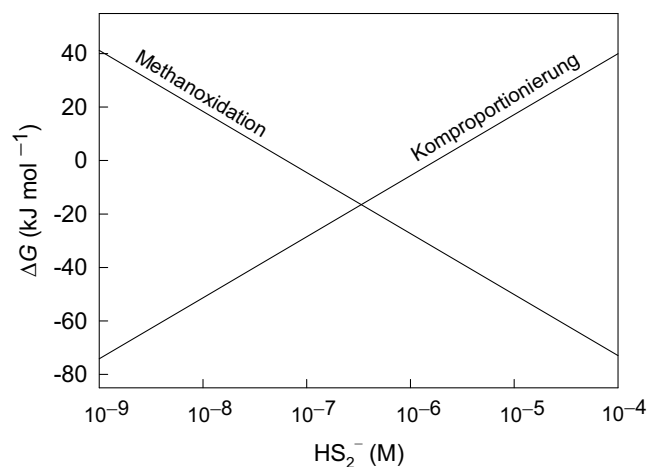
**Abbildung 30.** Modell für den extrazellulären Elektronentransfer in AOM über ein Schwefel/Polysulfid-Zyklus. Die anaeroben methanotrophen Archaeen (ANME) würden Polysulfide ( $HS_n^-$ ), z.B. das Disulfid ( $HS_2^-$ ), als Elektronenakzeptor nutzen, die Sulfat reduzierenden Bakterien (SRB) Sulfid als Elektronendonator.



Polysulfide stehen in einem vom pH-Wert abhängigen thermodynamischen Gleichgewicht mit Sulfid und elementarem Schwefel. Bei sehr geringer Polysulfidkonzentration ist das Disulfid  $HS_2^-$  die häufigste Schwefelspezies bei neutralem pH-Wert (Giggenbach 1972; Kamyshny et al. 2004). AOM könnte mit  $HS_2^-$  als Elektronenakzeptor durch ANME (Gl. 19), eine Komproportionierung von Sulfat und Sulfid zu  $HS_2^-$  durch die SRB (Gl. 20) katalysiert

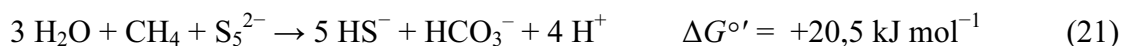
werden (Abb. 30). Im Gegensatz zur Schwefel-Disproportionierung (Abschnitt F.3.) ist eine Komproportionierung von Sulfat und Sulfid bisher noch nicht gezeigt worden.

Unter den in den AOM-Kulturen und in AOM-Standorten vorkommenden Bedingungen wäre eine Komproportionierung unterhalb von ca. 2  $\mu\text{M}$   $\text{HS}_2^-$  exergon (Abb. 31). Allerdings ergibt sich bei der Annahme des Disulfides als vorherrschende Polysulfid-Spezies eine starke Abhängigkeit von der Sulfidkonzentration (Gl. 20). Bei einem pH-Wert von 8 liegt die Konzentration des Disulfides, die eine Komproportionierung ermöglicht, bei ca. 50 nM bei gleichen Aktivitäten  $a_i$ .



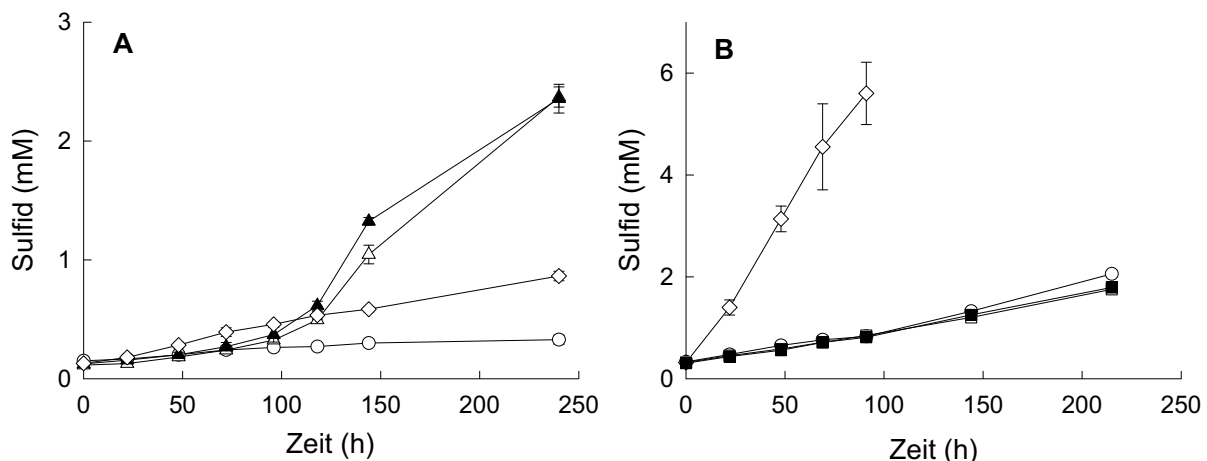
**Abbildung 31.** Gibbs-Energie der Oxidation von Methan gekoppelt an die Reduktion von Disulfid (pro Mol Methan), und der Komproportionierung von Sulfid und Sulfat (pro Mol Sulfat) in Abhängigkeit von der Disulfidkonzentration. Verwendete Aktivitätskoeffizienten und Konzentrationen:  $\gamma(\text{HS}_2^-) = 0,5$  (geschätzt);  $\gamma(\text{HS}^-) = 0,5$ ;  $\gamma(\text{SO}_4^{2-}) = 0,1$ ;  $\gamma(\text{HCO}_3^-) = 0,5$ ;  $[\text{CH}_4] = 2 \text{ atm}$ ;  $[\text{HS}^-] = 1 \text{ mM}$ ;  $[\text{SO}_4^{2-}] = 28 \text{ mM}$ ;  $[\text{HCO}_3^-] = 30 \text{ mM}$ ; pH 7.

Bei etwas höheren Schwefelkonzentration sind bei neutralem pH-Wert Tetrasulfid  $\text{S}_4^{2-}$  und Pentasulfid  $\text{S}_5^{2-}$  die häufigsten Polysulfide im Gleichgewicht (Giggenbach 1972; Kamyshny et al. 2004). Die Konzentration von  $\text{S}_5^{2-}$ , die zugleich eine Schwefelrespiration mit Methan (Gl. 21) und eine Komproportionierung (Gl. 22) zulässt, liegt im Bereich von 10 nM.



Es ist möglich, dass ANME die biochemischen Voraussetzungen für eine Disulfidrespiration besitzen. Methanogene Archaeen verwenden das Heterodisulfid aus Coenzym M und Coenzym B als Elektronenakzeptor und einige thermophile und hypothermophile Archaeen

können elementaren Schwefel oder Polysulfide veratmen (Hedderich et al. 1999). Auf der Seite der SRB wäre die Reaktion der Dsr mit Sulfid als Elektronendonator exergon, da das Redoxpotential von  $\text{SO}_3^-/\text{HS}^-$  ( $E^{\circ'} = -116 \text{ mV}$ ) höher liegt als das des Paares  $[\text{S}^0]/\text{HS}^-$  ( $E^{\circ'} = -270 \text{ mV}$ ) (Thauer et al. 1977). Dabei könnten die Elektronen aus dem Sulfid über Cytochrome und/oder Menachinone auf die [Fe-S]-Zentren der Dsr übertragen werden (Schiffer et al. 2008).

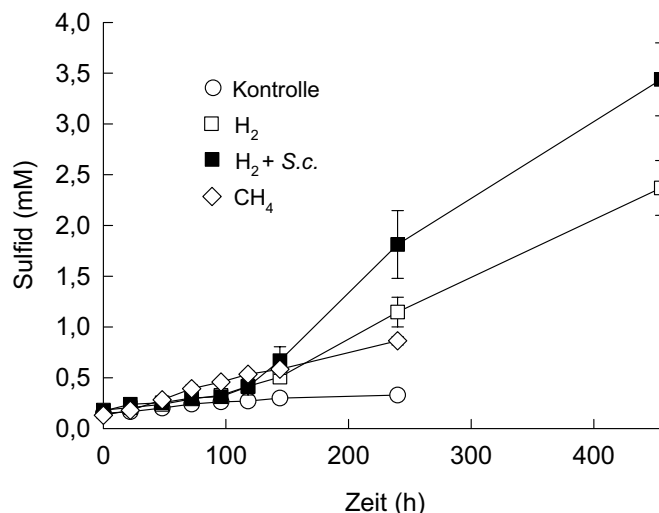


**Abbildung 32.** Effekt der Zugabe von Zellsuspensionen Schwefel reduzierender Mikroorganismen auf die Sulfatreduktion in mikrobiellen Matten aus dem Schwarzen Meer BS 328-153 (zugesetzt pro 10 ml-Ansatz: 2  $\text{mg}_{\text{dw}}$  in A, 30  $\text{mg}_{\text{dw}}$  in B). (A) Sulfidbildung mit 2,5 mM Ethanol ohne ( $\Delta$ ) und mit *Desulfuromonas acetoxidans* ( $2,2 \times 10^9$  Zellen) ( $\blacktriangle$ ) (B) Sulfidbildung mit 5 mM Succinat ohne ( $\square$ ) und mit *Desulfuromonas succinoxidans* ( $3,6 \times 10^8$  Zellen) ( $\blacksquare$ ). Die Raten der Sulfidproduktion mit und ohne Zusatz von *D. succinoxidans* unterschieden sich nicht. Sulfidbildung mit Sulfat als Elektronenakzeptor ohne Elektronendonator ( $\circ$ ) und mit Methan ( $\diamond$ ).  $\text{MW} \pm \text{SA}$  ( $n=3$ ).

Die Hypothese, dass der Elektronentransfer zwischen ANME und den assoziierten SRB über einen internen Schwefelkreislauf stattfindet, und die SRB somit  $\text{SO}_4^{2-}$  und  $\text{HS}^-$  zu Polysulfid komproportionieren, wurde in Kokultur-Experimenten überprüft. Mikrobiellen Matten aus dem schwarzen Meer (Probe 328-153) und Anreicherungen aus dem Mittelmeer (Amon MV), die AOM in hoher Rate katalysierten, wurden aktive Zellsuspensionen von *Desulfuromonas acetoxidans* und *Desulfuromonas succinoxidans* (Abb. 32) zugesetzt. Diese können Polysulfid/Schwefel je nach Art mit Acetat, Ethanol, Succinat oder Wasserstoff veratmen, und die Polysulfid-Konzentration so verringern, dass eine Komproportionierung durch die SRB möglich wäre (thermodynamische Berechnungen, nicht gezeigt). Wären die ANME-assoziierten SRB Komproportionierer und bildeten sie Polysulfide, so müssten die initialen Sulfatreduktionsraten in Abwesenheit von Methan bei Zugabe der Schwefelreduzierer und deren Substrat im Bereich der AOM-Raten liegen. Dies war bei keiner der Kulturen der Fall.

Der Zusatz von Ethanol führte zu einer anfangs exponentiell ansteigenden Sulfidproduktion, was vermutlich auf die Anreicherung eines Ethanol-verwertenden SRB zurückzuführen war. Die Sulfidproduktion in den Ansätzen mit und ohne *D. acetoxidans* unterschied sich nicht. Auch in Inkubationen mit den AOM-Anreicherungen vom Amon MV konnte durch die Zugabe von *D. acetoxidans* oder *D. succinoxidans* keine Stimulation der Sulfatreduktion hervorgerufen werden (Daten nicht gezeigt).

In weiteren Experimenten wurde eine Zellsuspension des Kohlenmonoxid- und Wasserstoff-oxidierenden Schwefelreduzierers *Sulfurospirillum carboxydovorans* zugesetzt. Mit Wasserstoff als Elektronendonator führte dies lediglich zu einer kurzzeitigen und verzögerten Steigerung der Sulfatreduktionsrate gegenüber der Kontrolle ohne Zusatz des Schwefelreduzierers (Abb. 33). In den Inkubationen der Schwarzmeermatten mit *S. carboxydovorans* und 5% Kohlenmonoxid konnte eine Sulfatreduktionsrate bestimmt werden, die der mit Wasserstoff entsprach (Daten nicht gezeigt), und darauf zurückzuführen ist, dass der Stamm Kohlenmonoxid zur Wasserstoffbildung nutzt, wenn kein Schwefel als Elektronenakzeptor zur Verfügung steht. In allen Experimenten war die Sulfidproduktionsraten axenischer Kontrollen der Schwefelreduzierer-Suspensionen mit Schwefel als Elektronenakzeptor deutlich höher als die initialen Sulfatreduktionsraten der mikrobiellen Matten mit Ethanol bzw. Succinat, so dass die potentielle Polysulfid-Reduktionsrate nicht limitierend war.



**Abbildung 33.** Effekt der Zugabe von *Sulfurospirillum carboxydovorans* ( $4,0 \times 10^8$  Zellen) auf die Sulfatreduktion in mikrobiellen Matten aus dem Schwarzen Meer (Probe 328-153). Sulfidbildung mit Sulfat ohne Elektronendonator ( $\circ$ ) und mit Methan ( $\diamond$ , 2 atm), mit Wasserstoff (1 bar,  $\square$ ), mit Wasserstoff (1 bar) und *S. carboxydovorans* ( $\blacksquare$ ) (MW $\pm$ SA, (n=3)).

Ein Problem stellt die niedrige intermediäre Polysulfidkonzentration der Komproportionierung dar, die unter den *in vitro* Bedingungen bei 1 mM HS<sup>-</sup> etwa 2 µM betragen würde. Eine Polysulfidrespiration mit 2,5 mM Ethanol wäre noch unterhalb von 1 µM HS<sub>2</sub><sup>-</sup> möglich. Die beobachteten K<sub>m</sub>-Werte für die Polysulfidreduktion bei *Wollinella succinogenes* lagen allerdings im Bereich von 10 µM (Hedderich et al. 1999). Für eine solche intermediäre Polysulfid-Konzentration bei der Komproportionierung wären im Gleichgewicht etwa 3 mM HS<sup>-</sup> notwendig.

Um Komproportionierer aus den AOM-Kulturen zu isolieren, wurden Agar-Verdünnungsreihen angesetzt. Dazu wurden zunächst Vorverdünnungen von AOM-Kulturen in Flüssigmedium angelegt. Jeder Verdünnungsstufe wurde vor dem Zusatz des Agars mit Zellsuspensionen von *D. acetoxidans* oder *D. succinoxidans* (etwa 10<sup>7</sup> Zellen ml<sup>-1</sup>) versetzt, so dass eine hohe Zelldichte von Schwefelreduzieren im Agar gewährleistet war. Polysulfid bildende SRB sollten als Mischkolonien mit den Schwefelreduzieren isoliert werden. In den Agar-Verdünnungsröhrchen, die neben den AOM-Kulturen auch Schwefelreduzierer enthielten, konnten mehr Kolonien beobachtet werden. Die Kolonieform und -farbe unterschied sich jedoch nicht gegenüber der Kontrolle ohne Schwefelreduzierer. Dennoch wurden einige Kolonien gepickt und in Flüssigmedium transferiert, das Wachstum der Organismen erfolgte aber unabhängig von der Zugabe der Schwefelreduzierer.

Parallel zu den Inkubationen mit Schwefelreduzieren wurde einer AOM-Kultur kontinuierlich und mit sehr geringer Rate 0,05 bis 0,18 mM d<sup>-1</sup> Polysulfide (Na<sub>2</sub>S<sub>3</sub>) als möglicher Elektronenakzeptor der ANME angeboten. In den Inkubationen mit Sulfat inhibierte dies nicht die Sulfidbildung, es konnte aber keine Methan-abhängige Sulfidbildung in den sulfatfreien Ansätzen mit Polysulfid gefunden werden (Deusner & Widdel, unpublizierte Ergebnisse). Da weder eine Polysulfid-abhängige anaerobe Methanoxidation noch eine Komproportionierung von Sulfid und Sulfat zu Schwefel gezeigt werden konnte, wird die extrazellulären Elektronenübertragung in der AOM von den ANME zu den SRB höchstwahrscheinlich nicht über das Redoxpaar Sulfid/Polysulfid vermittelt.

### Weitere Elektronenüberträger

Auch **Cyanocobalamin** (5 µM) und **Resazurin** (1 mg l<sup>-1</sup>) besaßen keinen Effekt auf die Methan-abhängige Sulfatreduktion. **Phenazine** wurden als endogene Redoxmediatoren bei *Pseudomonas* spp. beschrieben. Das von *Pseudomonas aeruginosa* Stamm KRP1 als Mediator synthetisierte Phenazin (Rabaey et al. 2005) besitzt allerdings möglicherweise ein zu hohes Redoxpotential, um als Elektronenüberträger in der AOM zu fungieren. Mit den

synthetischen Phenazinen Phenazinmethosulfat und Phenazinethosulfat als jeweils einzigen Elektronenakzeptoren wurde keine Methanoxidation im Sediment vom Hydratrücken beobachtet (Nauhaus et al. 2005). Studien mit weiteren Phenazinen stehen noch aus. Phenazine sind auch deshalb interessant, weil *Methanosarcinales* in ihrer Membran Methanophenazin enthalten, das in die Elektronenübertragung bei der Heterodisulfid-Respiration involviert ist (Abschnitt C.2.).

### **Abschließende Bemerkungen zu den Elektronenüberträger-Experimenten**

Viele der getesteten Komponenten besaßen keinen Effekt auf die AOM, die Methan-abhängige Sulfatreduktion, oder sie stimulierten in höheren Konzentrationen nicht die (Methan-unabhängige) Sulfatreduktion. Man mag anführen, dass sich ANME und die assoziierten Bakterien bereits optimal aneinander angepasst haben, und der Zusatz von Verbindungen keinen Effekt hervorrufen kann. Andererseits könnten die zugesetzten Verbindungen gar nicht die Zellen erreichen, da diese in Konsortien aggregiert und in eine Matrix aus extrazellulären polymeren Substanzen (EPS) eingebettet sind. Letzterem sei entgegen gehalten, dass die Hemmung der AOM durch Bromoethansulfonat (BES) (Hoehler et al. 1994; Nauhaus et al. 2005; Orcutt et al. 2008), Flavinen, Anthrachinonen zeigt, dass die Zellen, auch die ANME im Zentrum der Konsortien zugänglich für zugesetzte Verbindungen sind. Daher ist es auch wahrscheinlich, dass der Zusatz des *in vivo*- Elektronenüberträgers, wenn er die Zellen erreicht, eine Endprodukt-Hemmung der AOM bewirkt. Weiterhin gibt es keinen Grund, warum die Sulfatreduktion bei Zusatz des *in vivo*-Elektronendonators nicht stimuliert werden sollte, zumal sich die Sulfatreduzierer an der Außenseite der Konsortien befinden.

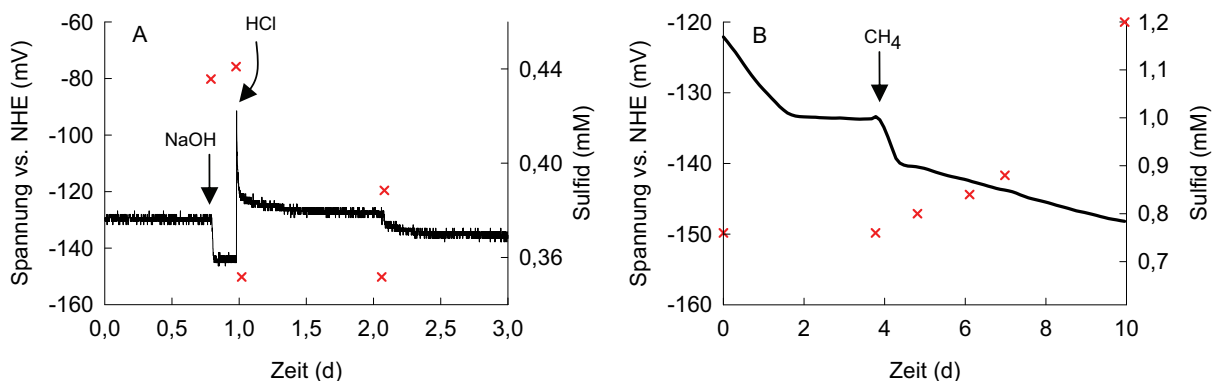
Auch der Zusatz von Zellsuspensionen Polysulfid reduzierender Bakterien mit ihrem Elektronendonator in den Kokultur-Experimenten besaß keinen Effekt auf die Sulfatreduktion. Die zugesetzten Zellen sollten jeweils einen der beiden Partner des Konsortiums ersetzen. Um teilweise eine Aufspaltungen der ANME/DSS-Konsortien zu erreichen, wurden die AOM-Kulturen zunächst mechanisch homogenisiert. Zudem wurde meistens eine dichte Suspension zugesetzt, und z.T. für einen Tag mit der ANME-Kultur vorinkubiert, um die Chancen einer Interaktion zu erhöhen. Beispiele für solche künstliche Syntrophen sind Interaktionen zwischen Methanogenen und *Moorella* sp. Stamm AMP oder *Desulfovibrio* sp. Stamm G11 in der syntrophen Oxidation von Formiat (Dolfing et al. 2008) sowie die syntrophe Oxidation von Acetat durch *Geobacter sulfurreducens* und *Wollinella succinogenes* (Kaden et al. 2002).

### 2.3 Elektrochemische Zellen zur Untersuchung der AOM

Eine weitere Möglichkeit, den extrazellulären Elektronentransfer zwischen Mikroorganismen zu studieren, ist der Einsatz von elektrochemischen Zellen bzw. mikrobiellen Brennstoffzellen („microbial fuel cell“, MFC). Es sind viele verschiedene Genera bekannt, die organische Substrate in MFCs oxidieren (Logan 2009; Rabaey et al. 2007). So ist es vorstellbar, dass auch ANME Elektronen aus der AOM auf eine Elektrode übertragen können. Diese Elektronenübertragung könnte über direkten Kontakt zur Elektrodenoberfläche oder über einen selbst produzierten Mediator (Abb. 5) stattfinden. Die Identifizierung des redox-aktiven Mediators wäre von hohem Interesse, da er auch in den Elektronentransfer zu den SRB involviert sein könnte. Die Kopplung von Methanoxidation an Elektrodenreduktion wäre auch von technologischem Interesse hinsichtlich der Entwicklung von Methan-Biosensoren.

#### Entwicklung einer anoxischen Brennstoffzelle zur Untersuchung von AOM

Im Unterschied zur Entwicklung von MFCs, die möglichst hohe Leistung erbringen sollen, war für die Entwicklung der elektrochemischen Zelle zur Untersuchung der AOM maßgeblich, dass die Zelle möglichst lange komplett anoxisch blieb. Daher wurde ein einfaches Design aus zwei Glasflaschen gewählt (Abb. 9), die über eine Kationen-selektive Membran miteinander verbunden waren. Durch die geringe Membranfläche erhöhte sich der interne Widerstand. AOM ist jedoch ein langsamer Prozess, und die Stromproduktion in MFCs ist bei geringen Strömen eher durch die Mikroorganismen als durch den internen Widerstand der Zelle limitiert (Rabaey & Verstraete 2005).

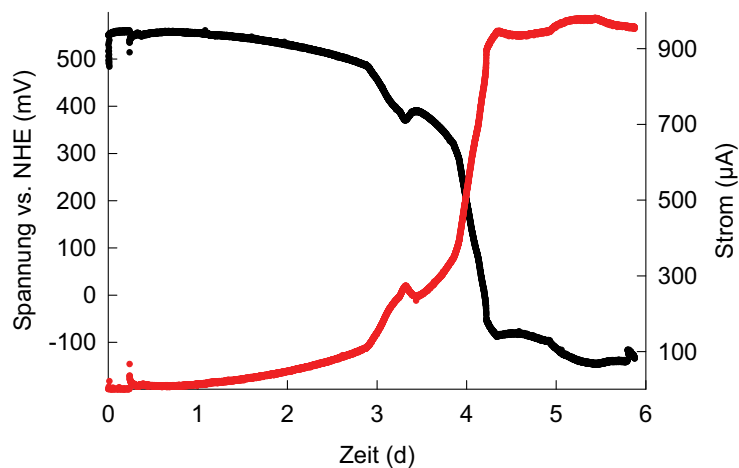


**Abbildung 34.** Einfluss der Sulfidkonzentration (×) auf das Potential der Arbeitselektrode/Anode (–) in SRB-Medium ohne Inokulum (A) und in einer Suspension von mikrobiellen Matten aus dem Schwarzen Meer, Probe P784 (B). Die Pfeile markieren den Zeitpunkt der Zugabe von NaOH und HCl bzw. Methan (1,5 atm).

In MFCs wurden anoxische Bedingungen meist durch kontinuierlichen Austausch des Gasraumes erreicht. In Vorversuchen führte das Spülen mit Stickstoff oder Methan jedoch zu einer Absenkung des Potentials der Zellen (Daten nicht gezeigt). Dieser Effekt ist dadurch zu erklären, dass Sulfid mit den Elektroden reagiert und maßgeblich das Redoxpotential in der Anodenzelle bestimmt (Abb. 34). Das Potential der Anode reagierte empfindlich auf Änderungen des pH-Wertes. Bei Zugabe von NaOH sank das Anodenpotential, da vermutlich mehr Sulfid in der deprotonierten Form als  $\text{HS}^-$  vorlag. Bei Zugabe von HCl sanken der pH-Wert und gleichzeitig die bestimmbare Sulfidkonzentration, während das Potential der Zelle stieg. Bei Spülen des Gasraumes stieg die bestimmbare Sulfidkonzentration, obwohl durch das Spülen des Gasraumes Sulfid ausgetrieben wurde. Über das Entfernen von  $\text{CO}_2$  aus dem Gasraum wurde eine Erhöhung des pH-Werts bewirkt (Daten nicht gezeigt), wodurch mehr Sulfid als  $\text{HS}^-$  (in Lösung) vorlag. Das Spülen des Gasraumes mit  $\text{N}_2/\text{CO}_2$  (90:10 v/v) hingegen führte zu einer Verringerung des pH-Wertes und damit zur Erhöhung des Potentials (Daten nicht gezeigt). Methan und Stickstoff besaßen keinen Einfluss auf das Potential (Daten nicht gezeigt). Die anoxischen Bedingungen in der elektrochemischen Zelle zur Untersuchung der AOM wurden also nicht durch das kontinuierliche Spülen des Gasraumes deren Aufbau gewährleistet (Abschnitt B.1.6).

Um die MFC zu testen, wurde die Stromproduktion von *Geobacter sulfurreducens* Stamm PCA mit 5 mM Acetat als Elektronendonator verfolgt. Dabei wurde das Potential der Anode nicht kontrolliert, sondern gegenüber der Referenz gemessen. Dadurch bestimmt das Potential der Anode gegenüber der Kathode die Stromrichtung und -stärke. Nach ca. 3 Tagen begann der exponentielle Verlauf der Strom- und Spannungskurve, der die Anlagerung von *G. sulfurreducens* an die Graphitelektrode und sein Wachstum widerspiegelt (Abb. 35). Dabei produzierte *G. sulfurreducens* maximal ca. 1 mA Strom ( $220 \text{ mA m}^{-2}$  Anodenoberfläche) bei einer maximalen Spannung von Anode gegenüber Kathode von ca. 0,56 V. Die Leistung betrug 0,54 mW bzw.  $120 \text{ mW m}^{-2}$  Anodenoberfläche. Die Werte sind etwas höher als die von Bond und Lovley (2003) ermittelten, die in ersten Versuchen mit *G. sulfurreducens* eine Leistungsdichte von  $65 \text{ mA m}^{-2}$  und  $13,1 \text{ mW m}^{-2}$  Anodenoberfläche bei 0,4 mA und 0,5 V bestimmten, aber Sauerstoff als Elektronenakzeptor eingesetzt hatten. In optimierten MFCs mit großer Membranoberfläche kann *G. sulfurreducens* Leistungsdichten von  $4,56 \text{ A m}^{-2}$  und  $1,88 \text{ W m}^{-2}$  Anodenoberfläche erreichen (Nevin et al. 2008).



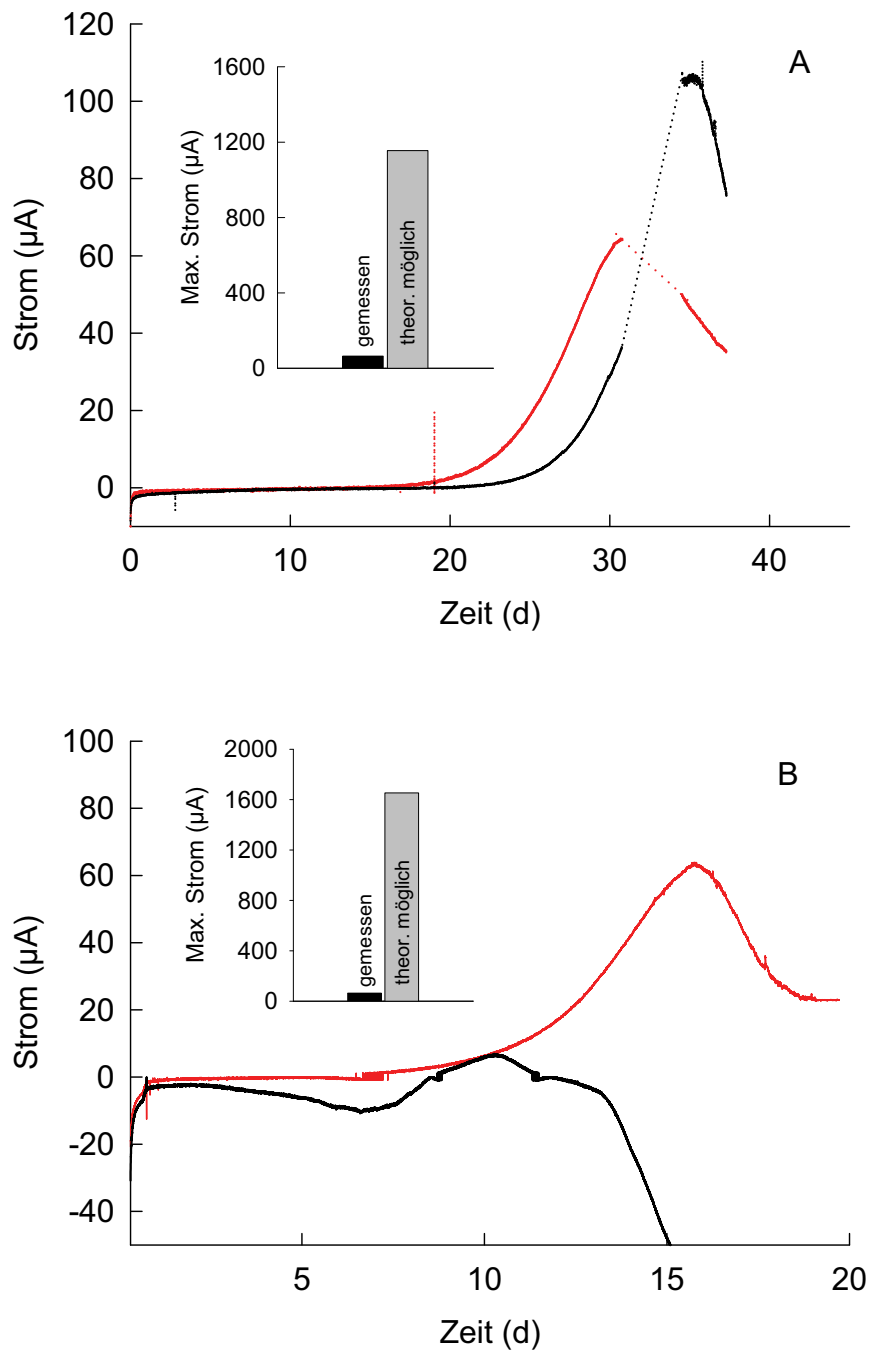


**Abbildung 35.** Stromproduktion von *Geobacter sulfurreducens* Stamm PCA mit 5 mM Acetat in der elektrochemischen Zelle. Dabei wurden das Potential der Anode (schwarz) und der Strom zwischen Anode (Graphitplatte, 45 cm<sup>2</sup>) und Kathode (rot) gemessen ( $R = 500 \Omega$ ).

### Untersuchungen zur AOM in der MFC

Die schwarzen mikrobiellen Matten aus dem schwarzen Meer (P784) wurden in der MFC zunächst auf ihre AOM-Aktivität mit Sulfat als Elektronenakzeptor getestet, ohne das Anode und Kathode verbunden waren (Abb. 34 B). Nachdem sich das Potential der Anode bei etwa  $-122 \text{ mV}$  gegenüber der Standardwasserstoffelektrode (vs. NHE) eingestellt hatte, wurde der Gasraum mit Methan befüllt. Innerhalb von 6 Tagen produzierten die Matten  $128 \mu\text{mol}$  Sulfid, und das Potential der Anode sank auf  $-149 \text{ mV}$  vs. NHE. In den nächsten Experimenten wurden die Matten in der MFC in Sulfat-freiem SRB-Medium unter Methan bzw. Stickstoff inkubiert. Als einziger Elektronenakzeptor wurde eine Graphitplatte bzw. Graphitfilz angeboten. Deren Potential wurden auf  $-177$  bzw.  $-150 \text{ mV}$  vs. NHE eingestellt (Abb. 9). Zu Beginn des Experimentes wurde keine deutliche Stromproduktion beobachtet (Abb. 36), obwohl  $0,5 \text{ mM}$  Sulfid im SRB-Medium enthalten war, und Sulfidoxidation an der Anode in anderen Experimenten oberhalb von  $-300 \text{ mV}$  vs. NHE festgestellt wurde (Rabaey et al. 2006). Im Gegensatz dazu stellte sich das vorgegebene Potential an den Anoden der elektrochemischen Zellen sowohl unter Stickstoff als auch unter Methan erst innerhalb von 10 bis 20 Tagen ein. Nach Erreichen des vorgegebenen Potentials stieg der Stromfluss von der Anode zur Kathode sowohl in den Inkubationen unter Stickstoff als auch unter Methan exponentiell an und bildete nach 35 bzw. 15 Tagen ein Strom-Maximum von 60 bis  $100 \mu\text{A}$ . Danach sank die Stromproduktion auf ein niedrigeres Niveau. Die unter Methan inkubierten Schwarzmeermatten in der Zelle mit dem Graphitfilz produzierte noch wochenlang stabil etwa  $20 \mu\text{A}$ , während die parallel unter Stickstoff inkubierte Zelle nach 10 Tagen aufoxidierte.

Obwohl geringfügige Unterschiede in den Strömen der MFCs unter Stickstoff und Methan gemessen wurden, sprechen mehrere Gründe dafür, dass unter den Versuchsbedingungen keine Methan-abhängiger Elektronentransfer zur Elektrode stattfand. Erstens kann die sehr lange Dauer aufgeführt werden, bis eine (positive) Stromproduktion einsetzte, obgleich man natürlich zumindest für die Graphitplatte argumentieren kann, dass die Organismen erst einmal physischen Kontakt zur Elektrodenoberfläche herstellen mussten. Zweitens konnte, mit Ausnahme der nach 10 Tagen oxidierenden Stickstoff-Zelle, kein wesentlicher Unterschied der Strom-Zeit-Kurven festgestellt werden, es fand also auch eine Stromproduktion in den Zellen mit Stickstoff ohne zugesetzten Elektronendonator statt. Die Elektronen für den beobachteten Stromfluss könnten aus Gärungen innerhalb der Schwarzmeermatten stammen. Drittens war die maximale Stromstärke in den Inkubationen mit Methan mehr als 100-mal kleiner als die theoretisch mögliche Stromproduktion, die aus der Methan-abhängigen Sulfidproduktion der Matten in den Vorinkubationen berechnet wurde (Abb. 36). Daher lässt sich schließen, dass in den MFCs unter den Versuchsbedingungen keine Methan-abhängige Elektrodenreduktion stattgefunden hat. Bisher gibt es auch keine Hinweise in der Literatur für anaerobe Methanoxidation an Elektroden. Man könnte anführen, dass das Anodenpotential nicht hoch genug gewählt war, um einen Transfer von Elektronen zur Elektrode zu ermöglichen, insbesondere da Spannungsverluste an der Elektrode auftreten können (Rabaey & Verstraete 2005). Ein zu hohes Anodenpotential hingegen könnte die Methanaktivierung durch die Mcr inhibieren (Abschnitt A.1.2). Das Redoxpotential  $E'$  der Methanoxidation zu Kohlendioxid liegt bei den *in vitro*-Konzentrationen von 1,5 atm CH<sub>4</sub> und 30 mM CO<sub>2</sub> bei -252 mV (bei pH 7). Bei dem gewählten Potentialen von -177 bzw. -150 mV vs. NHE bestand also eine Spannung von etwa 0,1 V zum Potential der AOM. Bei diesem Potential beträgt die Differenz der Gibbs- Energie ( $\Delta G'$ ) -77 kJ mol<sup>-1</sup> (Gl. 15). Mit Methan als Elektronendonator ermöglicht die Abgabe von Elektronen an Graphitelektroden also zumindest theoretisch einen größeren Energiegewinn als die Sulfatreduktion unter den gegebenen Bedingungen. Möglicherweise stellt aber der fehlende direkte Kontakt zur Elektrode das größte Problem dar. Da die ANME/SRB-Konsortien niedrige Wachstumsraten besitzen (Meulepas et al. 2009; Nauhaus et al. 2007), können sie vermutlich im Gegensatz z.B. zu *Geobacter* sp. keinen Biofilm direkt auf der Elektrode ausbilden. In den Experimenten wurde ein Graphitfilz mit einer großen Oberfläche angeboten, auf dem Flocken der Biomasse mit den AOM-Konsortien ein Pellet bildeten. Möglicherweise muss aber ein noch engerer Kontakt der Zellen mit der Elektrode hergestellt werden. Daher wäre ein interessanter neuer Ansatz die Einbettung lebender AOM-Kulturen in das Elektrodenmaterial, z.B. in Polymere.

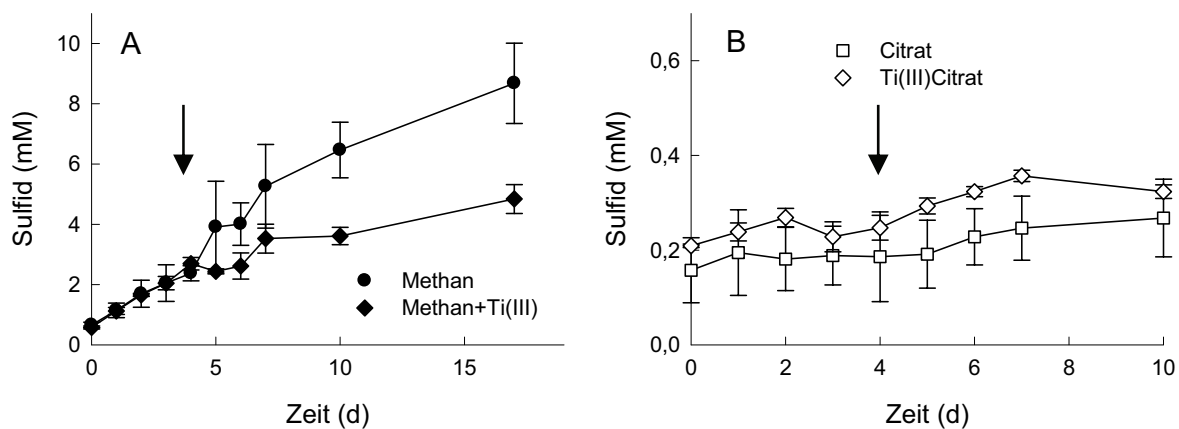


**Abbildung 36.** Stromproduktion einer Suspension von mikrobiellen Matten aus dem schwarzen Meer (P784) mit Stickstoff (1,5 atm; schwarz) bzw. Methan (1,5 atm; rot). (A) Anode aus planem Graphit ( $45 \text{ cm}^2$ ) und (B) Anode aus Graphitweichfilz (ca.  $113 \text{ cm}^2$ ). Das Potential der Anode war auf  $-177 \text{ mV vs. NHE}$  (A) bzw.  $-150 \text{ mV vs. NHE}$  (B) eingestellt. Der Elektronenfluß von der Anode zur Kathode ist als positiver Strom dargestellt. Eingefügt: Maximale Stromproduktion im Experiment (schwarzer Balken) gegenüber theoretisch möglichem Strom, berechnet aus der Methan-abhängigen Sulfidproduktionsrate (grauer Balken). (A) Daten zwischen Tag 30 und 34 fehlen. (B) Die Zelle mit dem Stickstoff war nach 10 Tagen aufoxidiert.

### Titan(III) als Elektronendonator für die Sulfatreduktion

Der Elektronentransfer in MFCs erfolgt entweder über Mediatoren, oder im direkten Kontakt der Zelle bzw. Zellstrukturen („Nanodrähte“). Falls ein direkter Elektronentransfer von den ANME zu den SRB stattfindet, so könnte dieser über Oberflächenproteine, z.B. Cytochrome in der Außenmembran (Abb. 5) katalysiert werden. Die AOM-aktiven mikrobiellen Matten aus dem Schwarzen Meer enthalten relativ große Mengen an Cytochromen (Abschnitt F.1.). ANME exprimieren Multihäm-Cytochrome vom *c*-Typ (Meyerdierks et al. 2009), die möglicherweise „Nanodrähte“ bilden.

Die Cytochrome im Extrakt der mikrobiellen Matten wurden durch die Zugabe von Titan(III)-Citrat reduziert (Daten nicht gezeigt). Daher könnte Titan Elektronendonator für die Sulfatreduktion sein. Weil Titan(III) aber nur ein Elektron überträgt, wurden der Kultur 2 mM Titan(III), gelöst in 2 mM Citrat, zugesetzt. Dies entspräche einer Sulfidbildung von 0,25 mM. Zusätzlich mussten nochmals 5 mM Citrat zugesetzt werden, um das Titan(III) zu komplexieren und eine abiotische Oxidation zu Ti(IV)-Hydroxid, sichtbar anhand der Trübung des Mediums, zu verhindern.



**Abbildung 37.** (A) Effekt der Zugabe von 2 mM Titan(III)-Citrat auf die Sulfidproduktion aus Sulfat (Sulfatreduktion) mit Methan (2 atm) in mikrobiellen Matten aus dem Schwarzen Meer (BS P784) bei 12°C. (B) Sulfatreduktion in BS P784 mit 2 mM Titan(III)-Citrat und 5 mM Citrat. Zugabe von Ti(III)-Citrat und Citrat nach vier Tagen.

Interessanterweise führte der Zusatz von 2 mM Titan(III) zumindest zu einer vorübergehenden Hemmung der Methan-abhängigen Sulfatreduktion (Abb. 37A). Möglicherweise ist dieser Effekt AOM-spezifisch, da 2 mM Titan(III) nicht toxisch für Methanogene ist (Bretler & Marison 1996; Fetzer & Conrad 1993; Zehnder & Wuhrmann

1976). Zudem wurde in Vorexperimenten mit Zellsuspensionen von *Desulfosarcina variabilis* keine Hemmung der Benzoat-abhängigen Sulfatreduktion festgestellt, und in den mikrobiellen Matten führte der Zusatz von Citrat (5 mM) auch in der Gegenwart von 2 mM Ti(III) zur Bildung von Sulfid (Daten nicht gezeigt). Versuche zum Effekt von Ti(III) auf die Methanoxidation hingegen stehen noch aus. Titan(III) stimulierte die Sulfatreduktion in den mikrobiellen Matten gegenüber der Kontrolle mit 5 mM Citrat (Abb. 37B) aber nicht erkennbar, und ebenso wenig in der Zellsuspension von *D. variabilis*. In den untersuchten Kulturen diente Ti(III) also nicht als Elektronendonator für die Sulfatreduktion. Möglicherweise besitzen DSS also keine extrazellulären Cytochrome oder „Nanodrähte“, an denen Titan(III) zu Ti(IV) reagiert. Zudem wurden „Nanodrähte“ oftmals bei Mikroorganismen beobachtet, die im Gegensatz zu ANME/SRB in den Konsortien nicht in engem Kontakt miteinander stehen (Gorby et al. 2006; Reguera et al. 2005).

## 2.4 Isolierung von SRB

Physiologische und biochemische Studien von Reinkulturen der ANME und der assoziierten Bakterien könnten grundlegend zum Verständnis der AOM beitragen, existieren aber nach heutigem Wissensstand nicht. Daher wurde mit verschiedenen Strategien versucht, die beteiligten SRB zu isolieren. Eine Strategie bestand in Verdünnungsreihen ausgehend direkt vom Probenmaterial. Als Inokulum standen dafür hoch aktive Anreicherungen von ANME-2/SRB zur Verfügung (Tabelle 1), die zuvor mechanisch homogenisiert wurden, um eine Abtrennung einzelner ANME- bzw. SRB-Zellen zu bewirken. Aus den Agar-Verdünnungsreihen wurden insgesamt 27 Isolate von SRB gewonnen (Tabelle 7).

**Tabelle 7.** Isolate aus Agar-Verdünnungsreihen der AOM-Anreicherungen

Isolate	Gattung*	Nächstverwandte Art* (% Sequenzidentität)	Substrat für die Isolierung
Amon-Ace-1,-2,-3	<i>Desulfobacter</i> sp.	n.b.	Acetat (5 mM)
BS-Ace-1,-2	<i>Desulfobacter</i> sp.	<i>D. psychrotolerans</i>	Acetat (5 mM)
BS-H <sub>2</sub> -2,-3,-5	<i>Desulfovibrio</i> sp.	n.b.	H <sub>2</sub> (1 atm)
BS-H <sub>2</sub> -4	<i>Desulfobulbus</i> sp.	n.b.	H <sub>2</sub> (1 atm)
HR-Ace-1,-2,-3,-4	<i>Desulfobacter</i> sp.	<i>D. psychrotolerans</i> (95–97)	Acetat (5 mM)
HR-Ace-5	<i>Desulfobacter</i>	<i>D. latus</i> (97)	Acetat (5 mM)
HR-Fo-1,-5,-6,-7,-9	<i>Desulfobacterium</i> sp.	<i>D. autotrophicum</i> (94–99)	Formiat (10 mM)
HR-Fo-8,-10	<i>Desulfobulbus</i> sp.	<i>D. mediterraneus</i> (95)	Formiat (10 mM)
HR-Fo-2,-21	<i>Desulfovibrio</i> sp.	n.b.	Formiat (10 mM)
HR-Fo-15	<i>Desulfopila</i> sp. ?	n.b.	Formiat (10 mM)
HR-Fo-20	<i>Desulfobacula</i> sp.	<i>D. toluolica</i> (97)	Formiat (10 mM)
HR-H <sub>2</sub> -1	<i>Desulfovibrio</i> sp.	n.b.	H <sub>2</sub> (1 atm)
HR-H <sub>2</sub> -2	<i>Desulfobacterium</i> sp.	n.b.	H <sub>2</sub> (1 atm)

\* nächstverwandte Reinkultur bei BLAST, zum Teil nur auf Basis von Partialsequenzen des 16S rRNA Gens  
n.b. nicht bestimmt

Die isolierten SRB sind 5–7 verschiedenen Gattungen zuzuordnen. Mit Acetat wurden ausschließlich *Desulfobacter* spp. isoliert, während Isolate auf Formiat und Wasserstoff aus

den Gattungen *Desulfovibrio*, *Desulfobulbus*, *Desulfobacterium*, *Desulfobacula* und möglicherweise *Desulfotalea* und *Desulfopila* stammen. Die Organismen, die in den Flüssigverdünnungsreihen direkt aus dem Probenmaterial mit den gleichen Substraten angereichert wurden, gehörten ebenfalls zu den genannten Gattungen. Es wurden keine SRB isoliert, die mit Methanthiol, Methanol, Kohlenmonoxid oder Methan als Elektronendonator wuchsen. In mikrobiellen Matten aus dem Schwarzen Meer, denen kontinuierlich Acetat bzw. Formiat in geringen Mengen ( $5 \text{ nmol min}^{-1}$ ) zugegeben wurde, um eine Selektion zugunsten langsam wachsender Mikroorganismen zu bewirken, reicherten sich ebenfalls SRB aus den Gattungen *Desulfobacter* bzw. *Desulfovibrio* an. Weiterhin wurden SRB als Begleitorganismen von Trimethylamin-verwertenden Methanogenen angereichert (Abschnitt F.4.). Diese stellten sich in molekularbiologischen Analysen ebenfalls als *Desulfovibrio* sp. heraus.

Trotz verschiedener Anreicherungsstrategien und langer Inkubationszeiten von mehr als einem Jahr wurden keine SRB der DSS-Gruppe und keine typischen ANME-assoziierten SRB angereichert oder isoliert, sondern andere SRB, die im Inokulum selten waren. Vermutlich wurde in den Ansätzen kein Elektronendonator angeboten, den die ANME-assoziierten SRB nutzen können. Andererseits könnten die ANME-assoziierten SRB auch auxotroph bezüglich einer bestimmten chemischen Komponente sein, die sie für das Wachstum benötigen. Es könnte sein, dass ANME und SRB sich gegenseitig benötigen, in dem Fall würden die SRB nicht wachsen, wenn ANME nicht auch ein bestimmtes Stoffwechselprodukt entfernen, wie im Falle der Komproportionierung von Sulfid und Sulfat zu Schwefel (Abschnitt C.2.2, Abschnitt F.3.). Die wichtige Frage des von den ANME zu den Bakterien transferierten Elektronenüberträgers und die Isolierung der ANME-assoziierten Bakterien sind also eng miteinander verknüpft; kennt man den Elektronenüberträger nicht, so ist es schwer die Bakterien zu isolieren, gelingt dies nicht, so kann man die Reinkultur nicht studieren, um neue Erkenntnisse über die Biochemie der AOM zu gewinnen.

### 3. Theoretische Überlegungen und Ausblick

Der Stoffwechselweg der AOM ist nicht geklärt. Während es gesichert scheint, dass die Methanaktivierung durch ANME in einer Umkehrung des letzten Schrittes der Methanbildung durch das Enzym Mcr katalysiert wird, besteht insbesondere die Frage, ob ANME oder die assoziierten Bakterien die AOM-gekoppelte Sulfatreduktion katalysieren. Falls die Bakterien diese durchführen, schließt sich die Frage an, wie der extrazelluläre Transfer von Reduktionsäquivalenten stattfindet. In diesem Abschnitt sollen einige theoretische Überlegungen dazu aufgeführt, und abschließend ein kleiner Ausblick auf mögliche Aspekte der zukünftigen AOM-Forschung gegeben werden.

Interessant sind Überlegungen, was die Vorteile einer syntrophen Interaktion in der AOM sein könnten. Vermutlich katalysieren ANME den entscheidenden Schritt der initialen Methanaktivierung. Daher könnte man fragen, weshalb sie die geringe Gibbs-Energie des Gesamtprozesses teilen sollten. In anderen Syntrophien, z.B. in der Nitrifikation besteht ein Vorteil in der Abkürzung von Stoffwechselwegen, was zu einer höheren Rate der ATP-Produktion und des Wachstums führt (Costa et al. 2006). Höhere Umsatzraten sind besonders im Falle von Konkurrenzen ein Vorteil, AOM ist aber, vorausgesetzt es gibt keine Konkurrenz zwischen den verschiedenen ANME-Gruppen, ein exklusiver Stoffwechselweg. Zudem müssten ANME aufgrund der niedrigen Gibbs-Energie bestrebt sein, die ATP-Ausbeute und nicht die ATP-Bildungsrate zu optimieren. Aus mechanistischer Sicht könnten sie einfach auf einen Reduktionsäquivalente entfernenden Partner angewiesen sein, wenn sie nicht die Fähigkeit zur Sulfatreduktion entwickelt haben. Zudem könnten sich die Stoffwechselwege der Sulfatreduktion und Methanogenese gegenseitig ausschließen, vielleicht aufgrund der Toxizität des Sulfits für die Mcr (Mahlert et al. 2002).

Die experimentellen Hinweise aus dieser Arbeit deuten darauf hin, dass die abundanten Enzyme für die Sulfatreduktion, zumindest in den mikrobiellen Matten aus dem Schwarzen Meer, von den SRB und nicht von ANME exprimiert werden, und diese Enzyme zudem in die AOM-gekoppelte Sulfatreduktion involviert sind.

Vermutlich findet also ein Transfer von Reduktionsäquivalenten von ANME zu den SRB statt. Interessanterweise verläuft der Elektronentransfer in der AOM nicht über einen der in methanogenen Syntrophien verbreiteten Elektronenüberträger Wasserstoff, Formiat oder Acetat. Eine weitere Möglichkeit bietet der Elektronentransfer über „Nanodrähte“, die aber zumeist in Biofilmen oder zwischen Einzelzellen über weite Distanzen ausgebildet werden. Ein direkter Elektronentransfer ohne Nanodrähte ist allerdings schwierig, da er zumindest in



den „Shell-Type“-Konsortien nur an der Grenzfläche der SRB und der ANME stattfinden könnte. Zudem zeigen elektronenmikroskopische Bilder, dass zumindest kein Kontakt der cytoplasmatischen Membranen der beiden Organismen besteht (J. Milučká, pers. Mitt.). Aufgrund der Ausbildung der Aggregate selbst und der z.T. unterschiedlichen Verteilung der Organismen in den Aggregaten halte ich es für wahrscheinlich, dass ein Elektronentransfer mittels eines Überträgermoleküls stattfindet. Dieses sollte klein sein, nicht schwierig zu synthetisieren, und nicht durch andere Mikroorganismen abgebaut werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedenen Hypothesen, die viele solcher Substanzen involvieren, bereits getestet und verworfen. Es ist aber nicht auszuschließen, dass der Elektronentransfer in der AOM über eine Modifikation eines der bereits getesteten Mechanismen oder über ein seltenes Molekül, etwa eine unbekannte Schwefelspezies verläuft. Für das weitere Vorgehen zur Aufklärung des Mechanismus der AOM erscheint mir eine Ausweitung des „Meta-biochemischen“ Ansatzes sinnvoll, der zum Teil in dieser Arbeit verfolgt wurde. Diese Studie hat gezeigt, dass man durch die Identifizierung und Charakterisierung abundanter Proteine aus einer AOM-Kultur wesentliche Einblicke in die an der AOM beteiligten Enzymreaktionen bekommt. Darauf aufbauend schließen sich folgende weiterführende Fragen und Überlegungen an:

- Sind die Enzyme für die Sulfatreduktion in allen AOM-Kulturen in den SRB lokalisiert? Da gegen die Sat und die Dsr gerichtete Antikörper existieren, könnte man diese auch in weiteren AOM-Kulturen einsetzen.
- Man könnte versuchen, den Stoffwechselweg der Sulfatreduktion in methanogenen Archaeen zu exprimieren, um zu sehen, ob diese dann Sulfatreduktion katalysieren. Neben der heterologen Expression der Nickelproteine („reverse Mcr“) aus den Matten wäre dies ein erster Schritt zur Erzeugung eines genetisch modifizierten Methanogenen, der dann möglicherweise auch AOM katalysieren könnte.
- Zudem sollten die Proteinextrakte aus den mikrobiellen Matten nach weiteren abundanten Enzymen untersucht werden, die an der AOM beteiligt sein könnten.
- Welche Rolle spielen die abundanten Cytochrome in den mikrobiellen Matten (Abschnitt F.1.)? Es wäre interessant, diese zu reinigen und über Immunolokalisation den ANME oder den SRB zuzuordnen.

- Weiterhin bietet sich über hochauflösende Massenspektrometrie (FT-ICR-MS) die Möglichkeit, Einblick in das Metabolom der AOM-Kulturen zu erhalten, und so einen potentiellen Elektronenüberträger zu identifizieren.

**D Literatur**

- Abken, H. J., Tietze, M., Brodersen, J., Bäumer, S., Beifuss, U. & Deppenmeier, U. (1998) Isolation and characterization of methanophenazine and function of phenazines in membrane-bound electron transport of *Methanosarcina mazei* Gö1. *Journal of Bacteriology* **180**, 2027–2032.
- Aeckersberg, F., Bak, F. & Widdel, F. (1991) Anaerobic oxidation of saturated hydrocarbons to CO<sub>2</sub> by a new type of sulfate-reducing bacterium. *Archives of Microbiology* **156**, 5–14.
- Aeckersberg, F., Rainey, F. A. & Widdel, F. (1998) Growth, natural relationships, cellular fatty acids and metabolic adaptation of sulfate-reducing bacteria that utilize long-chain alkanes under anoxic conditions. *Archives of Microbiology* **170**, 361–369.
- Ahring, B. K. & Westermann, P. (1988) Product inhibition of butyrate metabolism by acetate and hydrogen in a thermophilic coculture. *Applied and Environmental Microbiology* **54**, 2393–2397.
- Alain, K., Holler, T., Musat, F., Elvert, M., Treude, T. & Krüger, M. (2006) Microbiological investigation of methane- and hydrocarbon-discharging mud volcanoes in the Carpathian Mountains, Romania. *Environmental Microbiology* **8**, 574–590.
- Albert, D. B. & Martens, C. S. (1997) Determination of low-molecular-weight organic acid concentrations in seawater and pore-water samples via HPLC. *Marine Chemistry* **56**, 27–37.
- Amann, R. I., Krumholz, L. & Stahl, D. A. (1990) Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental studies in microbiology. *Journal of Bacteriology* **172**, 762–770.
- Amann, R. I., Ludwig, W. & Schleifer, K. H. (1995) Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Reviews* **59**, 143–169.
- Amend, J. P. & Shock, E. L. (2001) Energetics of overall metabolic reactions of thermophilic and hyperthermophilic archaea and bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* **25**, 175–243.
- Archer, D. (2007) Methane hydrate stability and anthropogenic climate change. *Biogeosciences* **4**, 521–544.
- Arendsen, A. F., Verhagen, M. F. J. M., Wolbert, R. B. G., Pierik, A. J., Stams, A. J. M., Jetten, M. S. M. & Hagen, W. R. (1993) The dissimilatory sulfite reductase from *Desulfosarcina variabilis* is a desulforubidin containing uncoupled metalated sirohemes and S = <sup>9</sup>/<sub>2</sub> iron-sulfur clusters. *Biochemistry* **32**, 10323–10330.
- Barnes, R. O. & Goldberg, E. D. (1976) Methane production and consumption in anoxic marine sediments. *Geology* **4**, 297–300.

- Beal, E. J., House, C. H. & Orphan, V. J. (2009) Manganese- and iron-dependent marine methane oxidation. *Science* **325**, 184–187.
- Bergel, A., Feron, D. & Mollica, A. (2005) Catalysis of oxygen reduction in PEM fuel cell by seawater biofilm. *Electrochemistry Communications* **7**, 900–904.
- Blumenberg, M., Seifert, R., Reitner, J., Pape, T. & Michaelis, W. (2004) Membrane lipid patterns typify distinct anaerobic methanotrophic consortia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 11111–11116.
- Boetius, A., Ferdelman, T. & Lochte, K. (2000a) Bacterial activity in sediments of the deep Arabian Sea in relation to vertical flux. *Deep-Sea Res. II* **47**, 2835–2875.
- Boetius, A., Ravensschlag, K., Schubert, C. J., Rickert, D., Widdel, F., Giesecke, A., Amann, R., Jørgensen, B. B., Witte, U. & Pfannkuche, O. (2000b) A marine microbial consortium apparently mediating anaerobic oxidation of methane. *Nature* **407**, 623–626.
- Bond, D. R. & Lovley, D. R. (2003) Electricity production by *Geobacter sulfurreducens* attached to electrodes. *Applied and Environmental Microbiology* **69**, 1548–1555.
- Bousquet, P., Ciais, P., Miller, J. B., Dlugokencky, E. J., Hauglustaine, D. A., Prigent, C., Van der Werf, G. R., Peylin, P., Brunke, E. G., Carouge, C., Langenfelds, R. L., Lathiere, J., Papa, F., Ramonet, M., Schmidt, M., Steele, L. P., Tyler, S. C. & White, J. (2006) Contribution of anthropogenic and natural sources to atmospheric methane variability. *Nature* **443**, 439–443.
- Bradford, M. M. (1976) Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**, 248–254.
- Bretler, G. & Marison, I. W. (1996) A medium optimization strategy for improvement of growth and methane production by *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *Journal of Biotechnology* **50**, 201–212.
- Brüggemann, N., Meier, R., Steigner, D., Zimmer, I., Louis, S. & Schnitzler, J. P. (2009) Nonmicrobial aerobic methane emission from poplar shoot cultures under low-light conditions. *New Phytologist* **182**, 912–918.
- Bryant, M. P. (1972) Commentary on Hungate technique for culture of anaerobic bacteria. *American Journal of Clinical Nutrition* **25**, 1324–1328.
- Bryant, M. P., Wolin, E. A., Wolin, M. J. & Wolfe, R. S. (1967) *Methanobacillus omelianskii*, a symbiotic association of 2 species of bacteria. *Archiv für Mikrobiologie* **59**, 20–31.
- Burggraf, S., Jannasch, H. W., Nicolaus, B. & Stetter, K. O. (1990) *Archaeoglobus profundus* sp. nov. represents a new species within the sulfate-reducing Archaeobacteria. *Systematic and Applied Microbiology* **13**, 24–28.
- Chemaly, S. M. (2008) Cobalamins and the spectrochemical series. *Dalton Transactions*, 5766–5773.

- Clauwaert, P., Rabaey, K., Aelterman, P., De Schamphelaire, L., Ham, T. H., Boeckx, P., Boon, N. & Verstraete, W. (2007) Biological denitrification in microbial fuel cells. *Environmental Science & Technology* **41**, 3354–3360.
- Cline, J. D. (1969) Spectrophotometric determination of hydrogen sulfide in natural waters. *Limnology and Oceanography* **14**, 454–458.
- Cooling, F. B., Maloney, C. L., Nagel, E., Tabinowski, J. & Odom, J. M. (1996) Inhibition of sulfate respiration by 1,8-dihydroxyanthraquinone and other anthraquinone derivatives. *Applied and Environmental Microbiology* **62**, 2999–3004.
- Cord-Ruwisch, R. (1985) A quick method for the determination of dissolved and precipitated sulfides in cultures of sulfate-reducing bacteria. *Journal of Microbiological Methods* **4**, 33–36.
- Costa, E., Perez, J. & Kreft, J. U. (2006) Why is metabolic labour divided in nitrification? *Trends in Microbiology* **14**, 213–219.
- Crabtree, R. H. (1995) Aspects of methane chemistry. *Chemical Reviews* **95**, 987–1007.
- Dahl, C., Speich, N. & Trüper, H. G. (1994) Enzymology and molecular biology of sulfate reduction in extremely thermophilic archaeon *Archaeoglobus fulgidus*. *Methods in Enzymology: Inorganic Microbial Sulfur Metabolism* **243**, 331–349.
- Dahl, C. & Trüper, H. G. (1994) Enzymes of dissimilatory sulfide oxidation in phototrophic bacteria. *Methods in Enzymology* **243**, 400–421.
- Dahl, C. & Trüper, H. G. (2001) Sulfite reductase and APS reductase from *Archaeoglobus fulgidus*. *Hyperthermophilic Enzymes, Pt B* **331**, 427–441.
- Daims, H., Brühl, A., Amann, R. & Schleifer, K. H. (1999) The domain-specific probe EUB338 is insufficient for the detection of all bacteria: development and evaluation of a more comprehensive probe set. *Systematic and Applied Microbiology* **22**, 434–444.
- DeLong, E. F. (1992) Archaea in coastal marine environments. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**, 5685–5689.
- Devol, A. H. (1983) Methane oxidation rates in the anaerobic sediments of Saanich Inlet. *Limnology and Oceanography* **28**, 738–742.
- Dey, M., Telser, J., Kunz, R. C., Lees, N. S., Ragsdale, S. W. & Hoffman, B. M. (2007) Biochemical and spectroscopic studies of the electronic structure and reactivity of a methyl-Ni species formed on methyl-coenzyme M reductase. *Journal of the American Chemical Society* **129**, 11030–11032.
- Dickens, G. R. (2003) Rethinking the global carbon cycle with a large, dynamic and microbially mediated gas hydrate capacitor. *Earth and Planetary Science Letters* **213**, 169–183.
- Dolfing, J., Jiang, B., Henstra, A. M., Stams, A. J. M. & Plugge, C. M. (2008) Syntrophic growth on formate: a new microbial niche in anoxic environments. *Applied and Environmental Microbiology* **74**, 6126–6131.

- Dolfing, J. & Tiedje, J. M. (1988) Acetate inhibition of methanogenic, syntrophic benzoate degradation. *Applied and Environmental Microbiology* **54**, 1871–1873.
- Duin, E. C. & McKee, M. L. (2008) A new mechanism for methane production from methyl-coenzyme M reductase as derived from density functional calculations. *Journal of Physical Chemistry B* **112**, 2466–2482.
- Dunfield, P. F., Yuryev, A., Senin, P., Smirnova, A. V., Stott, M. B., Hou, S. B., Ly, B., Saw, J. H., Zhou, Z. M., Ren, Y., Wang, J. M., Mountain, B. W., Crowe, M. A., Weatherby, T. M., Bodelier, P. L. E., Liesack, W., Feng, L., Wang, L. & Alam, M. (2007) Methane oxidation by an extremely acidophilic bacterium of the phylum Verrucomicrobia. *Nature* **450**, 879–U18.
- Dupre, S., Woodside, J., Foucher, J. P., de Lange, G., Mascle, J., Boetius, A., Mastalerz, V., Stadnitskaia, A., Ondreas, H., Huguen, C., Harmegnies, F. O., Gontharet, S., Loncke, L., Deville, E., Niemann, H., Omoregie, E., Roy, K. O. L., Fiala-Medioni, A., Dahlmann, A., Caprais, J. C., Prinzhofer, A., Sibuet, M., Pierre, C., Damste, J. S. S. & Party, N. S. (2007) Seafloor geological studies above active gas chimneys off Egypt (Central Nile deep sea fan). *Deep-Sea Research Part I-Oceanographic Research Papers* **54**, 1146–1172.
- Dutta, P. K., Keller, J., Yuan, Z. G., Rozendal, R. A. & Rabaey, K. (2009) Role of sulfur during acetate oxidation in biological anodes. *Environmental Science and Technology* **43**, 3839–3845.
- El-Naggar, M. Y., Gorby, Y. A., Xia, W. & Nealson, K. H. (2008) The molecular density of states in bacterial nanowires. *Biophysical Journal* **95**, L10–L12.
- Eller, G., Känel, L. K. & Krüger, M. (2005) Cooccurrence of aerobic and anaerobic methane oxidation in the water column of lake Plußsee. *Applied and Environmental Microbiology* **71**, 8925–8928.
- Emde, R., Swain, A. & Schink, B. (1989) Anaerobic oxidation of glycerol by *Escherichia coli* in an amperometric poised-potential culture system. *Applied Microbiology and Biotechnology* **32**, 170–175.
- Etiopie, G. & Klusman, R. W. (2002) Geologic emissions of methane to the atmosphere. *Chemosphere* **49**, 777–789.
- Ettwig, K. F., Shima, S., van de Pas-Schoonen, K. T., Kahnt, J., Medema, M. H., op den Camp, H. J. M., Jetten, M. S. M. & Strous, M. (2008) Denitrifying bacteria anaerobically oxidize methane in the absence of Archaea. *Environmental Microbiology* **10**, 3164–3173.
- Felbeck, H., Childress, J. J. & Somero, G. N. (1981) Calvin-Benson cycle and sulphide oxidation enzymes in animals from sulfide-rich habitats. *Nature* **293**, 291–293.
- Fetzer, S. & Conrad, R. (1993) Effect of redox potential on methanogenesis by *Methanosarcina barkeri*. *Archives of Microbiology* **160**, 108–113.

- Finke, N., Hoehler, T. M. & Jorgensen, B. B. (2007) Hydrogen 'leakage' during methanogenesis from methanol and methylamine: implications for anaerobic carbon degradation pathways in aquatic sediments. *Environmental Microbiology* **9**, 1060–1071.
- Forster, P., Ramaswamy, V., Artaxo, P., Bernsten, T., Betts, R., Fahey, D. W., Haywood, J., Lean, J., Lowe, D. C., Myhre, G., Nganga, J., Prinn, R., Raga, G., Schulz, M. & Van Dorland, R. (2007) Changes in atmospheric constituents and in radiative forcing. In *Climate change 2007: The physical science basis. Contribution of working group I to the fourth assessment report of the intergovernmental panel on climate change* (ed. S. Solomon, D. Qin, M. Manning, Z. Chen, M. Marquis, K. B. Averyt, M. Tignor & H. L. Miller). Cambridge, UK and New York, NY, USA: Cambridge University Press.
- Frederiksen, T. M. & Finster, K. (2003) Sulfite-oxido-reductase is involved in the oxidation of sulfite in *Desulfocapsa sulfoexigens* during disproportionation of thiosulfate and elemental sulfur. *Biodegradation* **14**, 189–198.
- Friedrich, M., Laderer, U. & Schink, B. (1991) Fermentative degradation of glycolic acid by defined syntrophic cocultures. *Archives of Microbiology* **156**, 398–404.
- Friedrich, M. W. (2002) Phylogenetic analysis reveals multiple lateral transfers of adenosine-5'-phosphosulfate reductase genes among sulfate-reducing microorganisms. *Journal of Bacteriology* **184**, 278–289.
- Fritz, G., Büchert, T., Huber, H., Stetter, K. O. & Kroneck, P. M. H. (2000) Adenylylsulfate reductases from archaea and bacteria are 1 : 1 alpha beta-heterodimeric iron-sulfur flavoenzymes - high similarity of molecular properties emphasizes their central role in sulfur metabolism. *FEBS Letters* **473**, 63–66.
- Fritz, G., Büchert, T. & Kroneck, P. M. H. (2002a) The function of the [4Fe-4S] clusters and FAD in bacterial and archaeal adenylylsulfate reductases - Evidence for flavin-catalyzed reduction of adenosine 5'-phosphosulfate. *Journal of Biological Chemistry* **277**, 26066–26073.
- Fritz, G., Roth, A., Schiffer, A., Buchert, T., Bourenkov, G., Bartunik, H. D., Huber, H., Stetter, K. O., Kroneck, P. M. H. & Ermler, U. (2002b) Structure of adenylylsulfate reductase from the hyperthermophilic *Archaeoglobus fulgidus* at 1.6 Å resolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**, 1836–1841.
- Galushko, A., Minz, D., Schink, B. & Widdel, F. (1999) Anaerobic degradation of naphthalene by a pure culture of a novel type of marine sulphate-reducing bacterium. *Environmental Microbiology* **1**, 415–420.
- Gavel, O. Y., Bursakov, S. A., Calvete, J. J., George, G. N., Moura, J. J. G. & Moura, I. (1998) ATP sulfurylases from sulfate-reducing bacteria of the genus *Desulfovibrio*. A novel metalloprotein containing cobalt and zinc. *Biochemistry* **37**, 16225–16232.
- Giggenbach, W. (1972) Optical spectra and equilibrium distribution of polysulfide ions in aqueous solution at 20° *Inorganic Chemistry* **11**, 1201–1207.

- Girguis, P. R., Cozen, A. E. & DeLong, E. F. (2005) Growth and population dynamics of anaerobic methane-oxidizing archaea and sulfate-reducing bacteria in a continuous-flow bioreactor. *Applied and Environmental Microbiology* **71**, 3725–3733.
- Girguis, P. R., Orphan, V. J., Hallam, S. J. & DeLong, E. F. (2003) Growth and methane oxidation rates of anaerobic methanotrophic archaea in a continuous-flow bioreactor. *Applied and Environmental Microbiology* **69**, 5472–5482.
- Goenrich, M., Duin, E. C., Mahlert, F. & Thauer, R. K. (2005) Temperature dependence of methyl-coenzyme M reductase activity and of the formation of the methyl-coenzyme M reductase red2 state induced by coenzyme B. *Journal of Biological Inorganic Chemistry* **10**, 333–342.
- Goodhew, C. F., Brown, K. R. & Pettigrew, G. W. (1986) Heme staining in gels, a useful tool in the study of bacterial *c*-type cytochromes. *Biochimica et Biophysica Acta* **852**, 288–294.
- Gorby, Y. A., Yanina, S., McLean, J. S., Rosso, K. M., Moyles, D., Dohnalkova, A., Beveridge, T. J., Chang, I. S., Kim, B. H., Kim, K. S., Culley, D. E., Reed, S. B., Romine, M. F., Saffarini, D. A., Hill, E. A., Shi, L., Elias, D. A., Kennedy, D. W., Pinchuk, G., Watanabe, K., Ishii, S., Logan, B., Nealson, K. H. & Fredrickson, J. K. (2006) Electrically conductive bacterial nanowires produced by *Shewanella oneidensis* strain MR-1 and other microorganisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 11358–11363.
- Grabarse, W., Mahlert, F., Duin, E. C., Goubeaud, M., Shima, S., Thauer, R. K., Lamzin, V. & Ermler, U. (2001) On the mechanism of biological methane formation: Structural evidence for conformational changes in methyl-coenzyme M reductase upon substrate binding. *Journal of Molecular Biology* **309**, 315–330.
- Gregory, K. B., Bond, D. R. & Lovley, D. R. (2004) Graphite electrodes as electron donors for anaerobic respiration. *Environmental Microbiology* **6**, 596–604.
- Gregory, K. B. & Lovley, D. R. (2005) Remediation and recovery of uranium from contaminated subsurface environments with electrodes. *Environmental Science & Technology* **39**, 8943–8947.
- Grundmann, O., Behrends, A., Rabus, R., Amann, J., Halder, T., Heider, J. & Widdel, F. (2008) Genes encoding the candidate enzyme for anaerobic activation of n-alkanes in the denitrifying bacterium, strain HxN1. *Environmental Microbiology* **10**, 376–385.
- Hall, T. A. (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 95–98.
- Hallam, S. J., Girguis, P. R., Preston, C. M., Richardson, P. M. & DeLong, E. F. (2003) Identification of methyl coenzyme m reductase A (*mcrA*) genes associated with methane-oxidizing archaea. *Applied and Environmental Microbiology* **69**, 5483–5491.
- Hallam, S. J., Putnam, N., Preston, C. M., Detter, J. C., Rokhsar, D., Richardson, P. M. & DeLong, E. F. (2004) Reverse methanogenesis: Testing the hypothesis with environmental genomics. *Science* **305**, 1457–1462.



- Hanson, R. S. & Hanson, T. E. (1996) Methanotrophic bacteria. *Microbiological Reviews* **60**, 439–471.
- Harder, J. (1997) Anaerobic methane oxidation by bacteria employing  $^{14}\text{C}$ -methane uncontaminated with  $^{14}\text{C}$ -carbon monoxide. *Marine Geology* **137**, 13–23.
- Harms, G., Rabus, R. & Widdel, F. (1999a) Anaerobic oxidation of the aromatic plant hydrocarbon *p*-cymene by newly isolated denitrifying bacteria. *Archives of Microbiology* **172**, 303–312.
- Harms, G., Zengler, K., Rabus, R., Aeckersberg, F., Minz, D., Rossello-Mora, R. & Widdel, F. (1999b) Anaerobic oxidation of *o*-xylene, *m*-xylene, and homologous alkylbenzenes by new types of sulfate-reducing bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **65**, 999–1004.
- Haveman, S. A., DiDonato, R. J., Villanueva, L., Shelobolina, E. S., Postier, B. L., Xu, B., Liu, A. & Lovley, D. R. (2008) Genome-wide gene expression patterns and growth requirements suggest that *Pelobacter carbinolicus* reduces Fe(III) indirectly via sulfide production. *Applied and Environmental Microbiology* **74**, 4277–4284.
- Haveman, S. A., Greene, E. A., Stilwell, C. P., Voordouw, J. K. & Voordouw, G. (2004) Physiological and gene expression analysis of inhibition of *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough by nitrite. *Journal of Bacteriology* **186**, 7944–7950.
- Hedderich, R., Klimmek, O., Kröger, A., Dirmeier, R., Keller, M. & Stetter, K. O. (1999) Anaerobic respiration with elemental sulfur and with disulfides. *FEMS Microbiology Reviews* **22**, 353–381.
- Heider, J. (2007) Adding handles to unhandy substrates: anaerobic hydrocarbon activation mechanisms. *Current Opinion in Chemical Biology* **11**, 188–194.
- Heller, C., Hoppert, M. & Reitner, J. (2008) Immunological localization of coenzyme M reductase in anaerobic methane-oxidizing archaea of ANME 1 and ANME 2 type. *Geomicrobiology Journal* **25**, 149–156.
- Hernandez, M. E., Kappler, A. & Newman, D. K. (2004) Phenazines and other redox-active antibiotics promote microbial mineral reduction. *Applied and Environmental Microbiology* **70**, 921–928.
- Hinderberger, D., Piskorski, R. R., Goenrich, M., Thauer, R. K., Schweiger, A., Harmer, J. & Jaun, B. (2006) A nickel-alkyl bond in an inactivated state of the enzyme catalyzing methane formation. *Angewandte Chemie-International Edition* **45**, 3602–3607.
- Hinrichs, K.-U., Hayes, J. M., Sylva, S. P., Brewer, P. G. & De Long, E. F. (1999) Methane-consuming archaeobacteria in marine sediments. *Nature* **398**, 802–805.
- Hinrichs, K. U. & Boetius, A. (2002) The anaerobic oxidation of methane: new insights in microbial ecology and biogeochemistry. In *Ocean margin systems* (ed. G. Wefer, D. Billett, D. Hebbeln, B. B. Jørgensen, M. Schlüter & T. C. E. vanWeering), pp. 457–477. Berlin: Springer Verlag.

- Hoehler, T. M., Alperin, M. J., Albert, D. B. & Martens, C. S. (1994) Field and laboratory studies of methane oxidation in an anoxic marine sediment - evidence for a methanogen-sulfate reducer consortium. *Global Biogeochemical Cycles* **8**, 451–463.
- Holler, T., Wegener, G., Knittel, K., Boetius, A., Brunner, B., Kuypers, M. M. M. & Widdel, F. (2009) Substantial  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  and D/H fractionation during anaerobic oxidation of methane by marine consortia enriched *in vitro* *Environmental Microbiology Reports* **1**, DOI: 10.1111/j.1758-2229.2009.00074.x.
- Itoh, T., Suzuki, K. & Nakase, T. (1998) *Thermocladium modestius* gen. nov., sp. nov., a new genus of rod-shaped, extremely thermophilic crenarchaeote. *International Journal of Systematic Bacteriology* **48**, 879–887.
- Itoh, T., Suzuki, K., Sanchez, P. C. & Nakase, T. (1999) *Caldivirga maquilingensis* gen. nov., sp. nov., a new genus of rod-shaped crenarchaeote isolated from a hot spring in the Philippines. *International Journal of Systematic Bacteriology* **49**, 1157–1163.
- Iversen, N. & Jørgensen, B. B. (1985) Anaerobic methane oxidation rates at the sulfate-methane transition in marine sediments from Kattegat and Skagerrak (Denmark). *Limnology and Oceanography* **30**, 944–955.
- Jørgensen, B. B. (1982) Mineralization of organic matter in the sea bed - the role of sulfate reduction. *Nature* **296**, 643–645.
- Kaden, J., Galushko, A. S. & Schink, B. (2002) Cysteine-mediated electron transfer in syntrophic acetate oxidation by cocultures of *Geobacter sulfurreducens* and *Wolinella succinogenes*. *Archives of Microbiology* **178**, 53–58.
- Kamyshny, A., Goifman, A., Gun, J., Rizkov, D. & Lev, O. (2004) Equilibrium distribution of polysulfide ions in aqueous solutions at 25 °C: A new approach for the study of polysulfides equilibria. *Environmental Science & Technology* **38**, 6633–6644.
- Keppler, F., Hamilton, J. T. G., Brass, M. & Rockmann, T. (2006) Methane emissions from terrestrial plants under aerobic conditions. *Nature* **439**, 187–191.
- Keppler, F., Hamilton, J. T. G., McRoberts, W. C., Vigano, I., Brass, M. & Rockmann, T. (2008) Methoxyl groups of plant pectin as a precursor of atmospheric methane: evidence from deuterium labelling studies. *New Phytologist* **178**, 808–814.
- Klimmek, O., Kröger, A., Steudel, R. & Holdt, G. (1991) Growth of *Wolinella succinogenes* with polysulfide as terminal acceptor of phosphorylative electron transport. *Archives of Microbiology* **155**, 177–182.
- Kniemeyer, O., Musat, F., Sievert, S. M., Knittel, K., Wilkes, H., Blumenberg, M., Michaelis, W., Classen, A., Bolm, C., Joye, S. B. & Widdel, F. (2007) Anaerobic oxidation of short-chain hydrocarbons by marine sulphate-reducing bacteria. *Nature* **449**, 898–901.
- Knittel, K. & Boetius, A. (2009) Anaerobic methane oxidation: Progress with an unknown process. *Annual Review of Microbiology* **63**, 311–334.

- Knittel, K., Boetius, A., Lemke, A., Eilers, H., Lochte, K., Pfannkuche, O., Linke, P. & Amann, R. (2003) Activity, distribution, and diversity of sulfate reducers and other bacteria in sediments above gas hydrate (Cascadia margin, Oregon). *Geomicrobiology Journal* **20**, 269–294.
- Knittel, K., Lösekann, T., Boetius, A., Kort, R. & Amann, R. (2005) Diversity and distribution of methanotrophic archaea at cold seeps. *Applied and Environmental Microbiology* **71**, 467–479.
- Kobayashi, K., Morisawa, Y., Ishituka, T. & Ishimoto, M. (1975) Biochemical studies on sulfate-reducing bacteria. 14. Enzyme levels of adenylylsulfate reductase, inorganic pyrophosphatase, sulfite reductase, hydrogenase, and adenosine-triphosphatase in cells grown on sulfate, sulfite, and thiosulfate. *Journal of Biochemistry* **78**, 1079–1085.
- Kopriva, S., Patron, N. J., Keeling, P. & Leustek, T. (2008) Phylogenetic analysis of sulfate assimilation and cysteine biosynthesis in phototrophic organisms. In *Advances in photosynthesis and respiration*, vol. 27 (ed. R. Hell, C. Dahl, D. B. Knaff & T. Leustek). Dordrecht, NL: Springer.
- Krämer, M. & Cypionka, H. (1989) Sulfate formation via ATP sulfurylase in thiosulfate-disproportionating and sulfite-disproportionating bacteria. *Archives of Microbiology* **151**, 232–237.
- Krüger, M., Blumenberg, M., Kasten, S., Wieland, A., Känel, L., Klock, J. H., Michaelis, W. & Seifert, R. (2008) A novel, multi-layered methanotrophic microbial mat system growing on the sediment of the Black Sea. *Environmental Microbiology* **10**, 1934–1947.
- Krüger, M., Meyerdierks, A., Glöckner, F. O., Amann, R., Widdel, F., Kube, M., Reinhardt, R., Kahnt, J., Böcher, R., Thauer, R. K. & Shima, S. (2003) A conspicuous nickel protein in microbial mats that oxidize methane anaerobically. *Nature* **426**, 878–881.
- Krüger, M., Treude, T., Wolters, H., Nauhaus, K. & Boetius, A. (2005) Microbial methane turnover in different marine habitats. *Palaeogeography Palaeoclimatology Palaeoecology* **227**, 6–17.
- Kung, L., Jr., Hession, A. O. & Bracht, J. P. (1998) Inhibition of sulfate reduction to sulfide by 9,10-anthraquinone in in vitro ruminal fermentations. *Journal of Dairy Science* **81**, 2251–2256.
- Kunz, R. C., Horng, Y. C. & Ragsdale, S. W. (2006) Spectroscopic and kinetic studies of the reaction of bromopropanesulfonate with methyl-coenzyme M reductase. *Journal of Biological Chemistry* **281**, 34663–34676.
- Kvenvolden, K. A. (2002) Methane hydrate in the global organic carbon cycle. *Terra Nova* **14**, 302–306.
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during assembly of head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–685.

- Lee, J. P., Legall, J. & Peck, H. D. (1973) Isolation of assimilatory-type and dissimilatory-type sulfite reductases from *Desulfovibrio vulgaris*. *Journal of Bacteriology* **115**, 529–542.
- Lewis, K. (1966) Symposium on bioelectrochemistry of microorganisms. 4. Biochemical fuel cells. *Bacteriological Reviews* **30**, 101–113.
- Leyh, T. S. & Suo, Y. (1992) GTPase-mediated activation of ATP sulfurylase. *Journal of Biological Chemistry* **267**, 542–545.
- Li, F., Hinderberger, J., Seedorf, H., Zhang, J., Buckel, W. & Thauer, R. K. (2008) Coupled ferredoxin and crotonyl coenzyme a (CoA) reduction with NADH catalyzed by the butyryl-CoA dehydrogenase/Etf complex from *Clostridium kluyveri*. *Journal of Bacteriology* **190**, 843–850.
- Logan, B. E. (2009) Exoelectrogenic bacteria that power microbial fuel cells. *Nature Reviews Microbiology* **7**, 375–381.
- Lösekann, T., Knittel, K., Nadalig, T., Fuchs, B., Niemann, H., Boetius, A. & Amann, R. (2007) Diversity and abundance of aerobic and anaerobic methane oxidizers at the Haakon Mosby mud volcano, Barents Sea. *Applied and Environmental Microbiology* **73**, 3348–3362.
- Lovley, D. R. (2008) The microbe electric: conversion of organic matter to electricity. *Current Opinion in Biotechnology* **19**, 564–571.
- Lovley, D. R., Coates, J. D., BluntHarris, E. L., Phillips, E. J. P. & Woodward, J. C. (1996) Humic substances as electron acceptors for microbial respiration. *Nature* **382**, 445–448.
- Mahlert, F., Bauer, C., Jaun, B., Thauer, R. K. & Duin, E. C. (2002) The nickel enzyme methyl-coenzyme M reductase from methanogenic archaea: In vitro induction of the nickel-based MCR<sub>ox</sub> EPR signals from MCR<sub>red2</sub>. *Journal of Biological Inorganic Chemistry* **7**, 500–513.
- Mander, G. J., Weiss, M. S., Hedderich, R., Kahnt, J., Ermler, U. & Warkentin, E. (2005) X-ray structure of the gamma-subunit of a dissimilatory sulfite reductase: Fixed and flexible C-terminal arms. *FEBS Letters* **579**, 4600–4604.
- Manz, W., Eisenbrecher, M., Neu, T. R. & Szewzyk, U. (1998) Abundance and spatial organization of gram-negative sulfate-reducing bacteria in activated sludge investigated by in situ probing with specific 16S rRNA targeted oligonucleotides. *FEMS Microbiology Ecology* **25**, 43–61.
- Marsili, E., Baron, D. B., Shikhare, I. D., Coursolle, D., Galnick, J. A. & Bond, D. R. (2008) *Shewanella* secretes flavins that mediate extracellular electron transfer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 3968–3973.
- Martens, C. S. & Berner, R. A. (1977) Interstitial water chemistry of anoxic Long Island Sound sediments. *Limnology and Oceanography* **22**, 10–25.

- Mayr, S., Latkoczy, C., Krüger, M., Gunther, D., Shima, S., Thauer, R. K., Widdel, F. & Jaun, B. (2008) Structure of an F<sub>430</sub> variant from archaea associated with anaerobic oxidation of methane. *Journal of the American Chemical Society* **130**, 10758–10767.
- McInerney, M. J., Struchtemeyer, C. G., Sieber, J., Mouttaki, H., Stams, A. J. M., Schink, B., Rohlin, L. & Gunsalus, R. P. (2008) Physiology, ecology, phylogeny, and genomics of microorganisms capable of syntrophic metabolism. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1125**, 58–72.
- McLeod, A. R., Fry, S. C., Loake, G. J., Messenger, D. J., Reay, D. S., Smith, K. A. & Yun, B. W. (2008) Ultraviolet radiation drives methane emissions from terrestrial plant pectins. *New Phytologist* **180**, 124–132.
- Messenger, D. J., McLeod, A. R. & Fry, S. C. (2009) The role of ultraviolet radiation, photosensitizers, reactive oxygen species and ester groups in mechanisms of methane formation from pectin. *Plant Cell and Environment* **32**, 1–9.
- Meulepas, R. J. W. (2009) Biotechnological aspects of anaerobic oxidation of methane coupled to sulfate reduction. In *Sub-department of Environmental Technology* Wageningen, NL: Wageningen University.
- Meulepas, R. J. W., Jagersma, C. G., Gieteling, J., Buisman, C. J. N., Stams, A. J. M. & Lens, P. N. L. (2009) Enrichment of anaerobic methanotrophs in sulfate-reducing membrane bioreactors. *Biotechnology and Bioengineering* **104**, 458–470.
- Meyer, B. & Küver, J. (2007) Phylogeny of the alpha and beta subunits of the dissimilatory adenosine-5'-phosphosulfate (APS) reductase from sulfate-reducing prokaryotes - origin and evolution of the dissimilatory sulfate-reduction pathway. *Microbiology* **153**, 2026–2044.
- Meyerdierks, A., Kube, M., Kostadinov, I., Teeling, H., Glöckner, F. O., Reinhardt, R. & Amann, R. (2009) Genome and mRNA expression analysis indicates the implication of multiple multiheme *c*-type cytochromes in the metabolism of anaerobic methanotrophic archaea of the ANME-1 group (*in press*). *Environmental Microbiology*
- Michaelis, W., Seifert, R., Nauhaus, K., Treude, T., Thiel, V., Blumenberg, M., Knittel, K., Gieseke, A., Peterknecht, K., Pape, T., Boetius, A., Aman, A., Jørgensen, B. B., Widdel, F., Peckmann, J., Pimenov, N. V. & Gulin, M. (2002) Microbial reefs in the Black Sea fueled by anaerobic oxidation of methane. *Science* **297**, 1013–1015.
- Moran, J. J., Beal, E. J., Vrentas, J. M., Orphan, V. J., Freeman, K. H. & House, C. H. (2008) Methyl sulfides as intermediates in the anaerobic oxidation of methane. *Environmental Microbiology* **10**, 162–173.
- Mori, K., Kim, H., Kakegawa, T. & Hanada, S. (2003) A novel lineage of sulfate-reducing microorganisms: Thermodesulfobiaceae fam. nov., *Thermodesulfobium narugense*, gen. nov., sp. nov., a new thermophilic isolate from a hot spring. *Extremophiles* **7**, 283–290.

- Muyzer, G., Teske, A., Wirsén, C. O. & Jannasch, H. W. (1995) Phylogenetic relationships of *Thiomicrospira* species and their identification in Deep Sea hydrothermal vent samples by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rDNA fragments. *Archives of Microbiology* **164**, 165–172.
- Nauhaus, K., Albrecht, M., Elvert, M., Boetius, A. & Widdel, F. (2007) *In vitro* cell growth of marine archaeal-bacterial consortia during anaerobic oxidation of methane with sulfate. *Environmental Microbiology* **9**, 187–196.
- Nauhaus, K., Boetius, A., Krüger, M. & Widdel, F. (2002) *In vitro* demonstration of anaerobic oxidation of methane coupled to sulphate reduction in sediment from a marine gas hydrate area. *Environmental Microbiology* **4**, 296–305.
- Nauhaus, K., Treude, T., Boetius, A. & Krüger, M. (2005) Environmental regulation of the anaerobic oxidation of methane: a comparison of ANME-I and ANME-II communities. *Environmental Microbiology* **7**, 98–106.
- Nevin, K. P. & Lovley, D. R. (2000) Potential for nonenzymatic reduction of Fe(III) via electron shuttling in subsurface sediments. *Environmental Science & Technology* **34**, 2472–2478.
- Nevin, K. P., Richter, H., Covalla, S. F., Johnson, J. P., Woodard, T. L., Orloff, A. L., Jia, H., Zhang, M. & Lovley, D. R. (2008) Power output and coulombic efficiencies from biofilms of *Geobacter sulfurreducens* comparable to mixed community microbial fuel cells. *Environmental Microbiology* **10**, 2505–2514.
- Newman, D. K. & Kolter, R. (2000) A role for excreted quinones in extracellular electron transfer. *Nature* **405**, 94–97.
- Niessen, J., Schröder, U., Harnisch, F. & Scholz, F. (2005) Gaining electricity from *in situ* oxidation of hydrogen produced by fermentative cellulose degradation. *Letters in Applied Microbiology* **41**, 286–290.
- Oliveira, T. F., Vornrhein, C., Matias, P. M., Venceslau, S. S., Pereira, I. A. C. & Archer, M. (2008) The crystal structure of *Desulfovibrio vulgaris* dissimilatory sulfite reductase bound to DsrC provides novel insights into the mechanism of sulfate respiration. *Journal of Biological Chemistry* **283**, 34141–34149.
- Ollivier, B., Cord-Ruwisch, R., Hatchikian, E. C. & Garcia, J. L. (1988) Characterization of *Desulfovibrio fructosovorans* sp.nov. *Archives of Microbiology* **149**, 447–450.
- Omeregic, E. O., Mastalerz, V., de Lange, G., Straub, K. L., Kappler, A., Roy, H., Stadnitskaia, A., Foucher, J. P. & Boetius, A. (2008) Biogeochemistry and community composition of iron- and sulfur-precipitating microbial mats at the Chefren mud volcano (Nile Deep Sea fan, Eastern Mediterranean). *Applied and Environmental Microbiology* **74**, 3198–3215.
- Orcutt, B., Boetius, A., Elvert, M., Samarkin, V. & Joye, S. B. (2005) Molecular biogeochemistry of sulfate reduction, methanogenesis and the anaerobic oxidation of methane at Gulf of Mexico cold seeps. *Geochimica Et Cosmochimica Acta* **69**, 4267–4281.

- Orcutt, B., Samarkin, V., Boetius, A. & Joye, S. (2008) On the relationship between methane production and oxidation by anaerobic methanotrophic communities from cold seeps of the Gulf of Mexico. *Environmental Microbiology* **10**, 1108–1117.
- Orphan, V. J., Hinrichs, K. U., Ussler, W., Paull, C. K., Taylor, L. T., Sylva, S. P., Hayes, J. M. & DeLong, E. F. (2001a) Comparative analysis of methane-oxidizing archaea and sulfate-reducing bacteria in anoxic marine sediments. *Applied and Environmental Microbiology* **67**, 1922–1934.
- Orphan, V. J., House, C. H., Hinrichs, K. U., McKeegan, K. D. & DeLong, E. F. (2001b) Methane-consuming archaea revealed by directly coupled isotopic and phylogenetic analysis. *Science* **293**, 484–487.
- Orphan, V. J., House, C. H., Hinrichs, K. U., McKeegan, K. D. & DeLong, E. F. (2002) Multiple archaeal groups mediate methane oxidation in anoxic cold seep sediments. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**, 7663–7668.
- Oyekola, O. & Pletschke, B. (2006) ATP-sulphurylase: An enzymatic marker for biological sulphate reduction? *Soil Biology & Biochemistry* **38**, 3511–3515.
- Park, D. H. & Zeikus, J. G. (2000) Electricity generation in microbial fuel cells using neutral red as an electronophore. *Applied and Environmental Microbiology* **66**, 1292–1297.
- Pelmenschikov, V., Blomberg, M. R. A., Siegbahn, P. E. M. & Crabtree, R. H. (2002) A mechanism from quantum chemical studies for methane formation in methanogenesis. *Journal of the American Chemical Society* **124**, 4039–4049.
- Pernthaler, A., Dekas, A. E., Brown, C. T., Goffredi, S. K., Embaye, T. & Orphan, V. J. (2008) Diverse syntrophic partnerships from-deep-sea methane vents revealed by direct cell capture and metagenomics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 7052–7057.
- Pfennig, N. & Biebl, H. (1976) *Desulfuromonas acetoxidans* gen. nov. and sp. nov. , a new anaerobic, sulfur-reducing, acetate-oxidizing bacterium. *Archives of Microbiology* **110**, 3–12.
- Pham, H., Boon, N., Marzorati, M. & Verstraete, W. (2009) Enhanced removal of 1,2-dichloroethane by anodophilic microbial consortia. *Water Research* **43**, 2936–2946.
- Phelps, T. J., Conrad, R. & Zeikus, J. G. (1985) Sulfate-dependent interspecies H<sub>2</sub> Transfer between *Methanosarcina barkeri* and *Desulfovibrio vulgaris* during coculture metabolism of acetate or methanol. *Applied and Environmental Microbiology* **50**, 589–594.
- Pimenov, N. V., Rusanov, I. I., Poglazova, M. N., Mityushina, L. L., Sorokin, D. Y., Khmelenina, V. N. & Trotsenko, Y. A. (1997) Bacterial mats on coral-like structures at methane seeps in the Black Sea. *Microbiology* **66**, 354–360.

- Pires, R. H., Lourenco, A. I., Morais, F., Teixeira, M., Xavier, A. V., Saraiva, L. M. & Pereira, I. A. C. (2003) A novel membrane-bound respiratory complex from *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 27774. *Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics* **1605**, 67–82.
- Pletschke, B. I., Rose, P. D. & Whiteley, C. G. (2002) The enzymology of sludge solubilisation utilising sulphate reducing systems identification and properties of ATP-sulphurylases. *Enzyme and Microbial Technology* **31**, 329–336.
- Pol, A., Heijmans, K., Harhangi, H. R., Tedesco, D., Jetten, M. S. M. & den Camp, H. J. M. O. (2007) Methanotrophy below pH1 by a new Verrucomicrobia species. *Nature* **450**, 874–878.
- Rabaey, K., Boon, N., Hofte, M. & Verstraete, W. (2005) Microbial phenazine production enhances electron transfer in biofuel cells. *Environmental Science & Technology* **39**, 3401–3408.
- Rabaey, K., Rodriguez, J., Blackall, L. L., Keller, J., Gross, P., Batstone, D., Verstraete, W. & Nealson, K. H. (2007) Microbial ecology meets electrochemistry: electricity-driven and driving communities. *ISME Journal* **1**, 9–18.
- Rabaey, K., Van de Sompel, K., Maignien, L., Boon, N., Aelterman, P., Clauwaert, P., De Schamphelaire, L., Pham, H. T., Vermeulen, J., Verhaege, M., Lens, P. & Verstraete, W. (2006) Microbial fuel cells for sulfide removal. *Environmental Science & Technology* **40**, 5218–5224.
- Rabaey, K. & Verstraete, W. (2005) Microbial fuel cells: novel biotechnology for energy generation. *Trends in Biotechnology* **23**, 291–298.
- Rabus, R., Fukui, M., Wilkes, H. & Widdel, F. (1996) Degradative capacities and 16S rRNA-targeted whole-cell hybridization of sulfate-reducing bacteria in an anaerobic enrichment culture utilizing alkylbenzenes from crude oil. *Applied and Environmental Microbiology* **62**, 3605–3613.
- Rabus, R., Hansen, T. A. & Widdel, F. (2006) Dissimilatory sulfate- and sulfur-reducing prokaryotes. In *The Prokaryotes - A handbook on the biology of bacteria*, vol. 2 (ed. M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K. H. Schleifer & E. Stackebrandt), pp. 659–768: Springer Science + Business Media, Inc.
- Rabus, R., Nordhaus, R., Ludwig, W. & Widdel, F. (1993) Complete oxidation of toluene under strictly anoxic conditions by a new sulfate-reducing bacterium. *Applied and Environmental Microbiology* **59**, 1444–1451.
- Raghoebarsing, A. A., Pol, A., van de Pas-Schoonen, K. T., Smolders, A. J. P., Ettwig, K. F., Rijpstra, W. I. C., Schouten, S., Damste, J. S. S., Op den Camp, H. J. M., Jetten, M. S. M. & Strous, M. (2006) A microbial consortium couples anaerobic methane oxidation to denitrification. *Nature* **440**, 918–921.
- Ragsdale, S. W. (2006) Metals and their scaffolds to promote difficult enzymatic reactions. *Chemical Reviews* **106**, 3317–3337.



- Ragsdale, S. W. (2007) Nickel and the carbon cycle. *Journal of Inorganic Biochemistry* **101**, 1657–1666.
- Reeburgh, W. S. (1976) Methane consumption in Cariaco Trench waters and sediments. *Earth and Planetary Science Letters* **28**, 337–344.
- Reeburgh, W. S. (1980) Anaerobic methane oxidation - rate depth distributions in Skan Bay sediments. *Earth and Planetary Science Letters* **47**, 345–352.
- Reeburgh, W. S. (1996) "Soft spots" in the global methane budget. In *Microbial Growth on C<sub>1</sub> Compounds* (ed. M. E. Lidstrom & F. R. Tabita), pp. 334–342. Intercept, Andover, UK: Kluwer Academic Publishers.
- Reeburgh, W. S. (2007) Oceanic methane biogeochemistry. *Chemical Reviews* **107**, 486–513.
- Reguera, G., McCarthy, K. D., Mehta, T., Nicoll, J. S., Tuominen, M. T. & Lovley, D. R. (2005) Extracellular electron transfer via microbial nanowires. *Nature* **435**, 1098–1101.
- Reguera, G., Nevin, K. P., Nicoll, J. S., Covalla, S. F., Woodard, T. L. & Lovley, D. R. (2006) Biofilm and nanowire production leads to increased current in *Geobacter sulfurreducens* fuel cells. *Applied and Environmental Microbiology* **72**, 7345–7348.
- Reitner, J., Peckmann, J., Blumenberg, M., Michaelis, W., Reimer, A. & Thiel, V. (2005a) Concretionary methane-seep carbonates and associated microbial communities in Black Sea sediments. *Palaeogeography Palaeoclimatology Palaeoecology* **227**, 18–30.
- Reitner, J., Peckmann, J., Reimer, A., Schumann, G. & Thiel, V. (2005b) Methane-derived carbonate build-ups and associated microbial communities at cold seeps on the lower Crimean shelf (Black Sea). *Facies* **51**, 71–84.
- Renosto, F., Martin, R. L., Borrell, J. L., Nelson, D. C. & Segel, I. H. (1991) ATP sulfurylase from trophosome tissue of *Riftia pachyptila* (hydrothermal vent tube worm). *Archives of Biochemistry and Biophysics* **290**, 66–78.
- Richter, H., Nevin, K. P., Jia, H. F., Lowy, D. A., Lovley, D. R. & Tender, L. M. (2009) Cyclic voltammetry of biofilms of wild type and mutant *Geobacter sulfurreducens* on fuel cell anodes indicates possible roles of OmcB, OmcZ, type IV pili, and protons in extracellular electron transfer. *Energy & Environmental Science* **2**, 506–516.
- Rubino, F. M., Pitton, M., Caneva, E., Pappini, M. & Colombi, A. (2008) Thiol-disulfide redox equilibria of glutathione metaboloma compounds investigated by tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **22**, 3935–3948.
- Schauder, R., Eikmanns, B., Thauer, R. K., Widdel, F. & Fuchs, G. (1986) Acetate oxidation to CO<sub>2</sub> in anaerobic bacteria via a novel pathway not involving reactions of the citric acid cycle. *Archives of Microbiology* **145**, 162–172.
- Schiffer, A., Fritz, G., Kroneck, P. M. H. & Ermler, U. (2006) Reaction mechanism of the iron-sulfur flavoenzyme adenosine-5'-phosphosulfate reductase based on the structural characterization of different enzymatic states. *Biochemistry* **45**, 2960–2967.

- Schiffer, A., Parey, K., Warkentin, E., Diederichs, K., Huber, H., Stetter, K. O., Kroneck, P. M. H. & Ermler, U. (2008) Structure of the dissimilatory sulfite reductase from the hyperthermophilic archaeon *Archaeoglobus fulgidus*. *Journal of Molecular Biology* **379**, 1063–1074.
- Schink, B. (1997) Energetics of syntrophic cooperation in methanogenic degradation. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **61**, 262–280.
- Schink, B. & Stams, A. (2006) Syntrophism among prokaryotes. In *The Prokaryotes - A handbook on the biology of bacteria. 3<sup>rd</sup> edition (online)*. vol. 2 (ed. M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K. H. Schleifer & E. Stackebrandt), pp. 309–336: Springer.
- Schink, B., Thiemann, V., Laue, H. & Friedrich, M. W. (2002) *Desulfotignum phosphitoxidans* sp nov., a new marine sulfate reducer that oxidizes phosphite to phosphate. *Archives of Microbiology* **177**, 381–391.
- Seeliger, S., Cord-Ruwisch, R. & Schink, B. (1998) A periplasmic and extracellular *c*-type cytochrome of *Geobacter sulfurreducens* acts as a ferric iron reductase and as an electron carrier to other acceptors or to partner bacteria. *Journal of Bacteriology* **180**, 3686–3691.
- Seifert, R., Nauhaus, K., Blumenberg, M., Krüger, M. & Michaelis, W. (2006) Methane dynamics in a microbial community of the Black Sea traced by stable carbon isotopes *in vitro*. *Organic Geochemistry* **37**, 1411–1419.
- Seki, Y., Nagai, Y. & Ishimoto, M. (1985) Characterization of a dissimilatory-type sulfite reductase, desulfovirodin, from *Desulfovibrio africanus* Benghazi. *Journal of Biochemistry* **98**, 1535–1543.
- Shilov, A. E. & Shul'pin, G. B. (1997) Activation of C–H bonds by metal complexes. *Chemical Reviews* **97**, 2879–2932.
- Shima, S. & Thauer, R. K. (2005) Methyl-coenzyme M reductase and the anaerobic oxidation of methane in methanotrophic Archaea. *Current Opinion in Microbiology* **8**, 643–648.
- So, C. M. & Young, L. Y. (1999) Isolation and characterization of a sulfate-reducing bacterium that anaerobically degrades alkanes. *Applied and Environmental Microbiology* **65**, 2969–2976.
- Sørensen, K. B., Finster, K. & Ramsing, N. B. (2001) Thermodynamic and kinetic requirements in anaerobic methane oxidizing consortia exclude hydrogen, acetate, and methanol as possible electron shuttles. *Microbial Ecology* **42**, 1–10.
- Sousa, D. Z., Smidt, H., Alves, M. M. & Stams, A. J. M. (2009) Ecophysiology of syntrophic communities that degrade saturated and unsaturated long-chain fatty acids. *FEMS Microbiology Ecology* **68**, 257–272.
- Sperling, D., Kappler, U., Wynen, A., Dahl, C. & Trüper, H. G. (1998) Dissimilatory ATP sulfurylase from the hyperthermophilic sulfate reducer *Archaeoglobus fulgidus* belongs to the group of homo-oligomeric ATP sulfurylases. *FEMS Microbiology Letters* **162**, 257–264.

- Stams, A. J. M., de Bok, F. A. M., Plugge, C. M., van Eekert, M. H. A., Dolfing, J. & Schraa, G. (2006) Exocellular electron transfer in anaerobic microbial communities. *Environmental Microbiology* **8**, 371–382.
- Stams, A. J. M. & Plugge, C. M. (2009) Electron transfer in syntrophic communities of anaerobic bacteria and archaea. *Nature Reviews Microbiology* **7**, 568–577.
- Stetter, K. O. (1988) *Archaeoglobus fulgidus* gen. nov. sp. nov. - a new taxon of extremely thermophilic archaebacteria. *Systematic and Applied Microbiology* **10**, 172–173.
- Stetter, K. O., Huber, R., Blochl, E., Kurr, M., Eden, R. D., Fielder, M., Cash, H. & Vance, I. (1993) Hyperthermophilic Archaea Are Thriving in Deep North-Sea and Alaskan Oil-Reservoirs. *Nature* **365**, 743–745.
- Stookey, L. L. (1970) Ferrozine - a new spectrophotometric reagent for iron. *Analytical Chemistry* **42**, 779–781.
- Straub, K. L. & Schink, B. (2003) Evaluation of electron-shuttling compounds in microbial ferric iron reduction. *FEMS Microbiology Letters* **220**, 229–233.
- Straub, K. L. & Schink, B. (2004) Ferrihydrite-dependent growth of *Sulfurospirillum deleyianum* through electron transfer via sulfur cycling. *Applied and Environmental Microbiology* **70**, 5744–5749.
- Tanimoto, Y. & Bak, F. (1994) Anaerobic degradation of methylmercaptan and dimethyl sulfide by newly isolated thermophilic sulfate-reducing bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **60**, 2450–2455.
- Tauer, R. K. (1998) Biochemistry of methanogenesis: a tribute to Marjory Stephenson. *Microbiology* **144**, 2377–2406.
- Tauer, R. K., Jungermann, K. & Decker, K. (1977) Energy conservation in chemotropic anaerobic bacteria. *Bacteriological Reviews* **41**, 100–180.
- Tauer, R. K., Kaster, A. K., Seedorf, H., Buckel, W. & Hedderich, R. (2008) Methanogenic archaea: ecologically relevant differences in energy conservation. *Nature Reviews Microbiology* **6**, 579–591.
- Tauer, R. K. & Shima, S. (2008) Methane as fuel for anaerobic microorganisms. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1125**, 158–170.
- Thomas, P. E., Ryan, D. & Levin, W. (1976) Improved staining procedure for detection of peroxidase activity of cytochrome *P*-450 on sodium dodecyl-sulfate polyacrylamide gels. *Analytical Biochemistry* **75**, 168–176.
- Thrash, J. C., Van Trump, J. I., Weber, K. A., Miller, E., Achenbach, L. A. & Coates, J. D. (2007) Electrochemical stimulation of microbial perchlorate reduction. *Environmental Science & Technology* **41**, 1740–1746.
- Treude, T. (2003) Anaerobic oxidation of methane in marine sediments. Ph.D.: Universität Bremen.

- Treude, T., Knittel, K., Blumenberg, M., Seifert, R. & Boetius, A. (2005) Subsurface microbial methanotrophic mats in the Black Sea. *Applied and Environmental Microbiology* **71**, 6375–6378.
- Treude, T., Orphan, V., Knittel, K., Gieseke, A., House, C. H. & Boetius, A. (2007) Consumption of methane and CO<sub>2</sub> by methanotrophic microbial mats from gas seeps of the anoxic black sea *Applied and Environmental Microbiology* **73**, 3770–3770.
- Valentine, D. L. (2002) Biogeochemistry and microbial ecology of methane oxidation in anoxic environments: a review. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology* **81**, 271–282.
- Valentine, D. L., Blanton, D. C. & Reeburgh, W. S. (2000) Hydrogen production by methanogens under low-hydrogen conditions. *Archives of Microbiology* **174**, 415–421.
- Valentine, D. L. & Reeburgh, W. S. (2000) New perspectives on anaerobic methane oxidation. *Environmental Microbiology* **2**, 477–484.
- van der Maarel, M. J. E. C., Quist, P., Dijkhuizen, L. & Hansen, T. A. (1993) Anaerobic degradation of dimethylsulfoniopropionate to 3-S-Methylmercaptopropionate by a marine *Desulfobacterium* strain. *Archives of Microbiology* **160**, 411–412.
- Van der Zee, F. R. & Cervantes, F. J. (2009) Impact and application of electron shuttles on the redox (bio)transformation of contaminants: A review. *Biotechnology Advances* **27**, 256–277.
- von Canstein, H., Ogawa, J., Shimizu, S. & Lloyd, J. R. (2008) Secretion of flavins by *Shewanella* species and their role in extracellular electron transfer. *Applied and Environmental Microbiology* **74**, 615–623.
- Wagner, M., Roger, A. J., Flax, J. L., Brusseau, G. A. & Stahl, D. A. (1998) Phylogeny of dissimilatory sulfite reductases supports an early origin of sulfate respiration. *Journal of Bacteriology* **180**, 2975–2982.
- Wallner, G., Amann, R. & Beisker, W. (1993) Optimizing fluorescent in situ hybridization with rRNA-targeted oligonucleotide probes for flow cytometric identification of microorganisms. *Cytometry* **14**, 136–143.
- Warikoo, V., McInerney, M. J., Robinson, J. A. & Suflita, J. M. (1996) Interspecies acetate transfer influences the extent of anaerobic benzoate degradation by syntrophic consortia. *Applied and Environmental Microbiology* **62**, 26–32.
- Wegener, G., Niemann, H., Elvert, M., Hinrichs, K. U. & Boetius, A. (2008) Assimilation of methane and inorganic carbon by microbial communities mediating the anaerobic oxidation of methane. *Environmental Microbiology* **10**, 2287–2298.
- Welander, P. V. & Metcalf, W. W. (2008) Mutagenesis of the C<sub>1</sub> oxidation pathway in *Methanosarcina barkeri*: New insights into the Mtr/Mer bypass pathway. *Journal of Bacteriology* **190**, 1928–1936.

- Widdel, F. & Bak, F. (1992) Gram-negative mesophilic sulfate-reducing bacteria. In *The Prokaryotes* (ed. A. T. Balows, H.G.; Dworkin, M., Harder, W.; and Schleifer, K.-H.), pp. 3352–3378. New York: Springer.
- Wrede, C., Heller, C., Reitner, J. & Hoppert, M. (2008) Correlative light/electron microscopy for the investigation of microbial mats from Black Sea Cold Seeps. *Journal of Microbiological Methods* **73**, 85–91.
- Yamamoto, S., Alcauskas, J. B. & Crozier, T. E. (1976) Solubility of methane in distilled water and seawater. *Journal of Chemical Engineering Data* **21**, 78–80.
- Yang, N., Reiher, M., Wang, M., Harmer, J. & Duin, E. C. (2007) Formation of a nickel-methyl species in methyl-coenzyme M reductase, an enzyme catalyzing methane formation. *Journal of the American Chemical Society* **129**, 11028–11029.
- Zehnder, A. J. B. & Brock, T. D. (1979) Methane formation and methane oxidation by methanogenic bacteria. *Journal of Bacteriology* **137**, 420–432.
- Zehnder, A. J. B. & Wuhrmann, K. (1976) Titanium(III) citrate as a nontoxic oxidation-reduction buffering system for the culture of obligate anaerobes. *Science* **194**, 1165–1166.
- Zeikus, J. G., Fuchs, G., Kenealy, W. & Thauer, R. K. (1977) Oxidoreductases involved in cell carbon synthesis of *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *Journal of Bacteriology* **132**, 604–613.
- Zengler, K., Richnow, H. H., Rossello-Mora, R., Michaelis, W. & Widdel, F. (1999) Methane formation from long-chain alkanes by anaerobic microorganisms. *Nature* **401**, 266–269.
- Zindel, U., Freudenberg, W., Rieth, M., Andreesen, J. R., Schnell, J. & Widdel, F. (1988) *Eubacterium acidaminophilum* sp.nov., a versatile amino acid degrading anaerobe producing or utilizing H<sub>2</sub> or formate - description and enzymatic studies. *Archives of Microbiology* **150**, 254–266.
- Zinder, S. H. & Koch, M. (1984) Non-aceticlastic methanogenesis from acetate - acetate oxidation by a thermophilic syntrophic coculture. *Archives of Microbiology* **138**, 263–272.



## **E Publikationen**

Im Rahmen dieser Arbeit ist ein Manuskript entstanden, das bei *Environmental Microbiology* eingereicht werden soll. Die Daten aus dem Manuskript sind im Ergebnisteil der Dissertation enthalten. Die angefügten Erläuterungen zeigen meinen Anteil an der Arbeit auf.

### **1. Identification of abundant enzymes for dissimilatory sulfate-reduction in microbial mats (Black Sea) mediating anaerobic oxidation of methane**

Mirko Basen, Martin Krüger, Jana Milučká, Jan Kuever, Olav Grundmann, Anke Meyerdierks, Friedrich Widdel and Seigo Shima

*Entwicklung des Konzepts zusammen mit M.K., F.W. und S.S., Durchführung der Versuchsplanung, Durchführung aller Enzymaktivitätsmessungen, Durchführung der Proteinreinigung und Charakterisierung mit M.K., J.M., O.G., und S.S., Durchführung der phylogenetischen Analysen mit J.K. und A.M., Erstellung des Manuskripts zusammen mit S.S. und F.W..*





**Identification of abundant enzymes for dissimilatory sulfate-reduction in microbial mats (Black Sea) mediating anaerobic oxidation of methane**

Mirko Basen,<sup>1</sup> Martin Krüger,<sup>2</sup> Jana Milučká,<sup>1</sup> Jan Kuever,<sup>3</sup> Olav Grundmann,<sup>1</sup> Anke Meyerdierks,<sup>1</sup> Friedrich Widdel,<sup>1\*</sup> and Seigo Shima<sup>4</sup>

Manuscript in preparation

<sup>1</sup>*Max Planck Institute for Marine Microbiology, 28359 Bremen, Germany.*

<sup>2</sup>*Federal Institute for Geosciences and Resources, 30655 Hannover, Germany.*

<sup>3</sup>*Bremen Institute for Materials Testing, 28199 Bremen, Germany.*

<sup>4</sup>*Max Planck Institute for Terrestrial Microbiology, 35043 Marburg, Germany.*

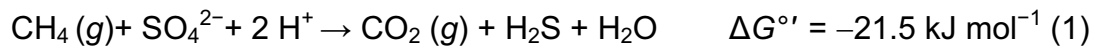
\*corresponding author

## Summary

Anaerobic oxidation of methane coupled to sulfate reduction (AOM) is a globally important sink for methane on earth. It is proposed that AOM in marine sediments is catalyzed syntrophically by microbial consortia composed of anaerobic methanotrophic archaea (ANME) and sulfate-reducing bacteria (SRB). However, the contribution of the SRB for AOM is not clear. Here we report, for the first time, on the identification of the dominant ATP sulfurylase (Sat), APS reductase (Apr) and dissimilatory sulfite reductase (Dsr) from microbial mats collected at methane seeps in the Black Sea. The mats revealed high AOM activity and mainly consist of ANME-2 archaea and SRB of the *Desulfosarcina/Desulfococcus* cluster. Cell-free mat extracts revealed activity of Sat, Apr and Dsr. Thereupon, the enzymes were partially purified by anion-exchange chromatography. N-terminal amino acid sequences of the isolated subunits revealed similarities to the respective bacterial enzymes. AprBA, obtained by PCR applying a degenerate primer specific for the obtained N-terminus, forms a new subcluster within the APS reductases of the *Desulfosarcina/Desulfococcus* cluster. These results show that the major sulfate-reducing enzymes in the Black Sea microbial mats are of bacterial origin, supporting the hypothesis that AOM is catalyzed syntrophically by ANME-2 archaea and SRB.

## Introduction

The anaerobic oxidation of methane (AOM) with sulfate according to



is the major sink for methane produced in deep anoxic marine sediments and thus of global importance (Reeburgh, 2007; Thauer et al., 2008). The coupling of methane oxidation to sulfate reduction rather than to oxygen respiration, as in terrestrial habitats, is explained by the abundance of the former ( $\text{SO}_4^{2-}$ , 28 mM;  $\text{O}_2$ , 0.3 mM) and the resulting deeper penetration as an electron acceptor into marine sediments.

AOM is usually catalyzed by compact aggregates of archaea closely related to methanogens and Deltaproteobacteria affiliating with distinct branches of sulfate-reducing bacteria (SRB), most commonly with the *Desulfosarcina* (DSS) clade (Boetius et al., 2000; Orphan et al., 2001a; Michaelis et al., 2002; Knittel et al., 2005). The most common view is that the archaea are the anaerobic methanotrophs (ANME) responsible for methane activation and further processing of methane carbon via reverse reactions of methanogenesis, while the Deltaproteobacteria are SRB scavenging reducing equivalents and producing sulfide (Zehnder and Brock, 1979; Hoehler et al., 1994; Harder, 1997; Boetius et al., 2000; Valentine et al., 2000).

Neither of the partners of the consortium has been isolated and grown so far in pure culture. Insights into the biochemistry of AOM were achieved by using the naturally enriched communities for metagenomic analyses and protein characterization. These studies provided insights almost exclusively into the archaeal partner and pathway of methane oxidation. The hypothesis of “reverse methanogenesis” was sustained by the finding of orthologs of almost all genes of the methanogenic pathway in the metagenome of ANME archaea in the natural samples (Hallam et al., 2004; Meyerdierks et al., 2005). The putative methane-activating enzyme, a dominant nickel protein closely related to methyl-coenzyme M reductase (Mcr), was purified from microbial mats with AOM activity from the Black Sea (Krüger et al., 2003). Furthermore, a Mcr-related protein could be localized in the archaeal cells of the mat community by immunostaining (Heller et al., 2008).

Comparable insights into the catabolic key genes and enzymes of the deltaproteobacterial partner and into the channeling of the methane-derived reducing equivalents into sulfate reduction are lacking so far. Growth of the associated

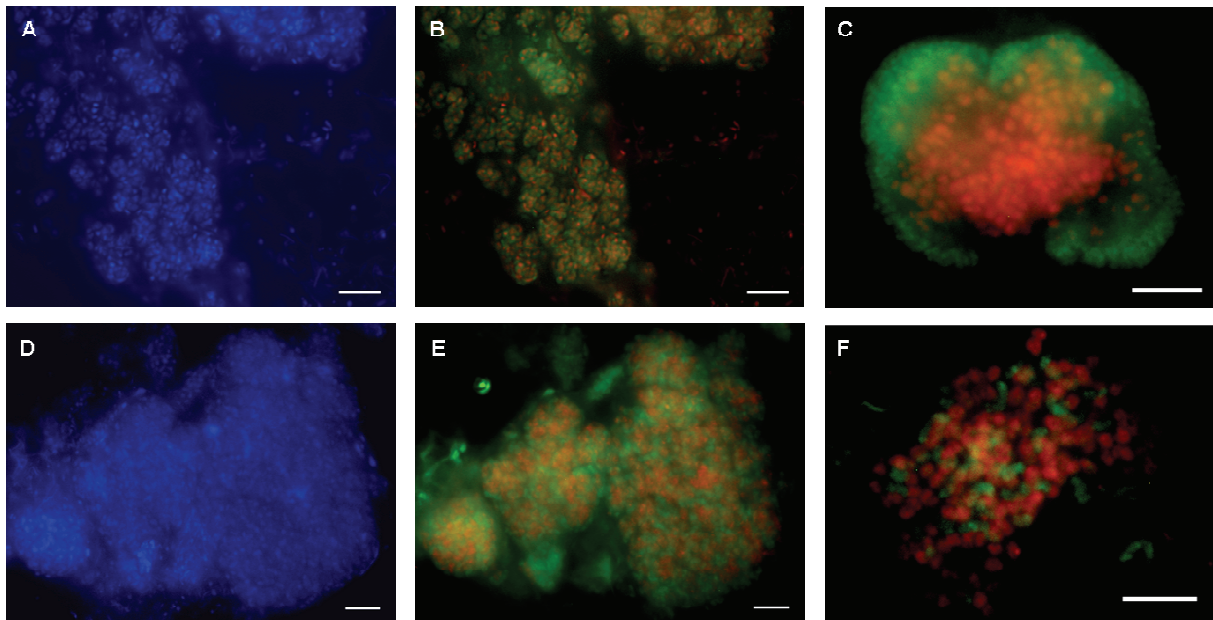
Deltaproteobacteria with H<sub>2</sub>, formate, acetate, or methanol as hypothesized methane-derived electron donors was essentially excluded (Nauhaus et al., 2002; Nauhaus et al., 2005). At some marine sites with AOM activity, detectable archaeal cells were not associated with bacteria (Orphan et al., 2002; Knittel et al., 2005; Orcutt et al., 2005; Lösekann et al., 2007; Treude et al., 2007). Hence, it cannot be excluded that at least some archaea in AOM habitats perform sulfate reduction in addition to methane oxidation. Dissimilatory sulfate reduction is indeed a well-established trait in Euryarchaeota, the genus *Archaeoglobus* (Stetter, 1988; Dahl et al., 1994). Genes for this pathway might have been acquired via lateral transfer from sulfate-reducing Firmicutes (Wagner et al., 1998; Friedrich, 2002; Meyer and Küver, 2007).

An important step towards an understanding of AOM-linked sulfate reduction to sulfide is expected from biochemical characterization of the potentially involved enzymes. Here we show that Black Sea microbial mats with AOM activity contain substantial amounts and activities of the three key enzymes for sulfate reduction, ATP sulfurylase (sulfate adenylyl transferase, Sat), adenosine-5'-phosphosulfate (APS) reductase (Apr), and dissimilatory sulfite reductase (Dsr). Sat as well as the small subunit of Apr (AprB) and native Dsr were isolated. Their N-terminal sequences were characteristic of deltaproteobacterial enzymes. Moreover, retrieval of the Apr-encoding genes (*aprBA*) revealed a close relationship to those in SRB of the deltaproteobacterial *Desulfosarcina* (DSS) clade. This finding parallels 16S rRNA based analyses showing that the deltaproteobacterial cells in the mats were phylogenetically related to the DSS clade. Taken together, the results support the assumption that sulfate reduction in the Black Sea mats with methane-derived reducing equivalents proceeds via the established sulfate reduction pathway and most likely takes place in the Deltaproteobacterial partner.

## Results and discussion

### *Microbiological characterization of Black Sea microbial mats*

Black Sea microbial reefs consist of carbonate chimney-like structures, up to 4 m in height and 1 m in diameter (Pimenov et al., 1997; Michaelis et al., 2002). The chimneys are covered by up to 10-cm thick microbial mats. The outer black part of the mat (black mat) harbors mostly typical shell-type consortia of ANME-2 archaea and SRB of the *Desulfosarcina/Desulfococcus* cluster (Blumenberg et al., 2004; Reitner et al., 2005; Krüger et al., 2008), while the interior, pinkish part of the mat (pink mat), surrounding the carbonate center, is dominated by mixed-type aggregates of ANME-1 as the archaeal partner.



**Fig. 1.** Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) of homogenized Black Sea microbial mats, sample P744 (A-C) and sample 328-153 (D-F), as used in incubation experiments (Fig.S1). (A;D) Representative parts of microbial mats, stained with DAPI. (B,E) Corresponding mat parts, FISH. Probe DSS 658 was used for *Desulfosarcina / Desulfococcus* clade (FITC, green signal) and probe ANME-2 538 was used for ANME-2 (Cy3, red signal). (C) Typical „shell-type“ consortium of ANME-2/DSS. (F) Mixed-type consortia with kidney-shaped DSS. Bar 5  $\mu$ m.

The two “black mat” samples (328-153 and P744) used in this study were obtained from the surface of chimneys, and they were similar according to their AOM activity and species composition. Both mats were clearly dominated by consortia of ANME-2

archaea and SRB (Fig. 1). Around 90% of all cells were aggregated in consortia, the proportions being approximately 45% of ANME-2 and 45% of SRB of the *Desulfosarcina/Desulfococcus* cluster. Sometimes several of these consortia were embedded in a matrix, forming super-consortia of more than 50  $\mu\text{m}$  size in diameter. No single ANME-1 cell, usually easily recognized by their rectangular shape, could be observed. In the sample P744 additionally long filamentous rod-shaped bacteria were observed, accounting for approximately 5–10% of all DAPI-stained cells.

Both mats showed methane-dependent sulfate reduction/AOM rates among the highest reported up to now from natural systems. The in vitro AOM activities at 12°C of the mats of station 1 and 2 were  $510 \pm 40 \mu\text{mol g}_{\text{dw}}^{-1} \text{d}^{-1}$  and  $200 \pm 20 \mu\text{mol g}_{\text{dw}}^{-1} \text{d}^{-1}$ , respectively (Fig. S1, Fig. S2). These rates are in the range of those in a sediment-free enrichment from Hydrate Ridge cultivated for 2 years ( $230 \mu\text{mol g}_{\text{dw}}^{-1} \text{d}^{-1}$ ) (Nauhaus et al., 2007) and higher than the AOM activities of the “pink mat” from the Black Sea (up to  $81 \mu\text{mol g}_{\text{dw}}^{-1} \text{d}^{-1}$ ) (Nauhaus et al., 2005). AOM could be determined starting from the first day without lag phase (Fig. S1) and the increase of sulfide, depending on methane supply, was linear. This indicates that the microbial mats are adapted to AOM. The highest AOM activities in sample 328-153 were recorded at 16°C, decreasing at higher and lower temperatures (Fig.S2). Sulfate reduction without substrate addition was not observed at 12°C and lower temperatures.

Here, unlike previous studies (Seifert et al., 2006), potential AOM activity and methanogenesis rates were examined in short-term incubations to avoid the enrichment of organisms which are not involved in AOM. In these short-term experiments, substantial methane formation without substrate addition was not determined (Fig. S1). Methane formation from methanol and trimethylamine was observed 4 days after substrate addition, and some hydrogenotrophic methanogenesis. However, the amount of methane formed from all substrates increased exponentially with time, showing that the mats are not naturally adapted to methanogenesis, but still harbor minor populations of fast-growing methanogens.

In conclusion, rate measurements and composition of the Black Sea black microbial mats used in this study clearly indicate that the mats are performing AOM rather than methanogenesis and consortia of ANME-2 archaea and SRB of the *Desulfosarcina/Desulfococcus cluster* are most probably the key organisms involved.

*Activity of the sulfate-reducing enzymes*

Dissimilatory sulfate reduction is observed only in bacteria and archaea, which mediate the reactions in a single canonical pathway, involving three enzymes and two intermediates. ATP sulfurylase (Sat, EC 2.7.7.4) activates sulfate by adenylation, yielding adenosine-5'-phosphosulfate (APS), which is reduced to sulfite by APS reductase (Apr, EC 1.8.99.2), releasing adenosine-monophosphate. Finally dissimilatory sulfite reductase (Dsr, EC 1.8.99.1) reduces sulfite to sulfide (Rabus et al., 2006).

**Table 1.** Specific activity of key enzymes for dissimilatory sulfate reduction in the cell-free extract of microbial mats (Black Sea) and pure cultures of sulfate-reducing bacteria

	Specific activity <sup>a</sup> (U mg <sup>-1</sup> )		
	ATP sulfurylase (Sat)	APS reductase (Apr)	Sulfite reductase <sup>b,c</sup> (Dsr)
BS P744	0.10	0.23	n.b.
BS 328-153	0.08	0.27	0.0002
<i>Desulfococcus multivorans</i>	0.38	0.38	n.b.
<i>Desulfosarcina variabilis</i>	0.49	0.90	0.013
<i>Desulfobacterium autotrophicum</i>	0.12	0.85	n.b.

<sup>a</sup> Determined at 28°C

<sup>b</sup> n.d., not determined

<sup>c</sup> Activity was not measurable in cell-free extract, due to inhibition (see text). Sulfite reductase activity in mat was measurable upon enzyme enrichment.

Activity of all three enzymes could be measured in the cell extract of the Black Sea microbial mats (Table 1). This is one of the first reports on the measurements of the activity of enzymes for sulfate reduction in environmental samples (Felbeck et al., 1981; Pletschke et al., 2002; Oyekola and Pletschke, 2006). For comparison, specific activities of these three enzymes were also determined in cell extracts of pure cultures of SRB. The observed Sat and Apr specific activities in cell extracts of pure cultures of sulfate-reducing bacteria were on average three times higher than in the Black Sea mat extracts. That is not unexpected because the Black Sea microbial mats are composed of ~45% of ANME-2 and ~45% of SRB, and maybe only one of

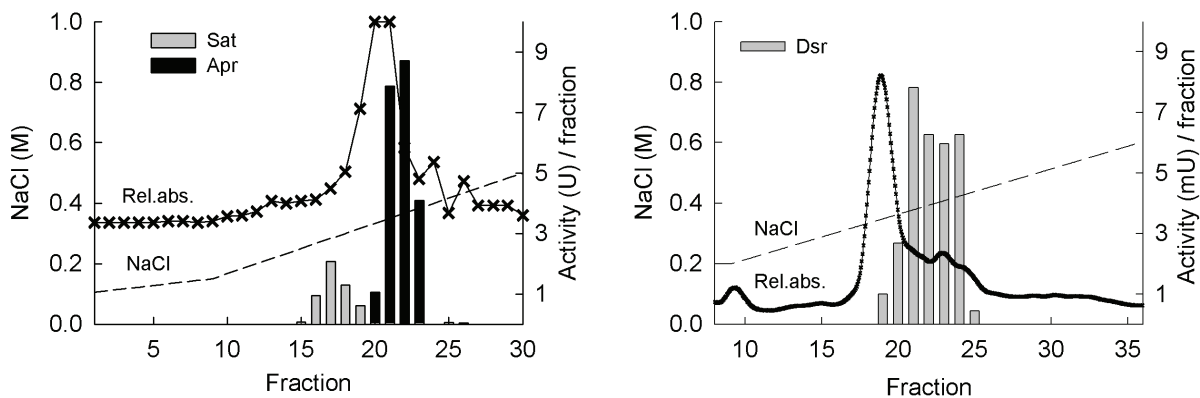
those could harbor a major fraction of the enzymes for sulfate reduction. The specific activities of Apr measured in the cell extracts of pure cultures in this study (Table 1) are in the range of those reported for sulfate-reducing bacteria ( $0.2\text{--}0.5\text{ U mg}^{-1}$ ) and -archaea ( $0.092\text{--}1.5\text{ U mg}^{-1}$ ) (Krämer and Cypionka, 1989; Dahl et al., 1994; Sperling et al., 1998; Fritz et al., 2000). However, the Sat activities determined were much lower than those reported for cell extracts of *Desulfovibrio* species ( $4\text{ U mg}^{-1}$ ) and of *Archaeoglobus fulgidus* ( $2\text{ U mg}^{-1}$ ). On the one hand, all cultures tested in this study belong to the Desulfobacteraceae, which could possess a lower Sat activity. On the other hand, Sat activity in the mat extract might be underestimated due to the activity of pyrophosphatases coexisting in the cell-free extract. N-terminal amino-acid sequencing of proteins obtained in the fractions of anion-exchange chromatography revealed the presence of a putative pyrophosphatase in the mat extracts. The specific activity of Dsr in cell-free extracts of Black Sea microbial mats was very low compared to those measured in the cell-free extracts of *Desulfosarcina variabilis* (Table 1) and published values ( $0.005\text{--}0.080\text{ U mg}^{-1}\text{ protein}$ ) (Lee et al., 1973; Kobayashi et al., 1975). In contrast, the total Dsr activity recovered in the fractions of anion exchange chromatography was 5-fold higher than the total activity in the soluble fraction (see below). Therefore, it cannot be excluded that Dsr in the mat extract was somehow inhibited in the assay condition applied.

But are the observed enzyme rates high enough to explain the total AOM activity? A ratio of  $0.28\text{ g protein g}_{\text{dw}}^{-1}$  was determined for the mat sample 328-153, which performed AOM at a specific rate of  $200\text{ }\mu\text{mol g}_{\text{dw}}^{-1}\text{ d}^{-1}$  at  $12^{\circ}\text{C}$  (see above). Hence specific AOM activity constitutes  $0.5\text{ nmol methane min}^{-1}\text{ and mg}^{-1}\text{ protein}$  ( $0.5\text{ mU mg}^{-1}$ ), which is higher than reported for the “pink mat sample” ( $0.1\text{ mU mg}^{-1}$ ; Krüger et al., 2003) and which is in the range of the estimated theoretical specific activity of “reverse” MCR (Shima and Thauer, 2005). As specific enzyme activities of about  $10\text{ mU mg}^{-1}$  for Sat and  $100\text{ mU mg}^{-1}$  for Apr were determined at  $12^{\circ}\text{C}$  (Fig. S2), Sat and Apr could account for the turnover of all reducing equivalents from anaerobic methane oxidation.



### Fractionation and characterization of the sulfate-reducing enzymes

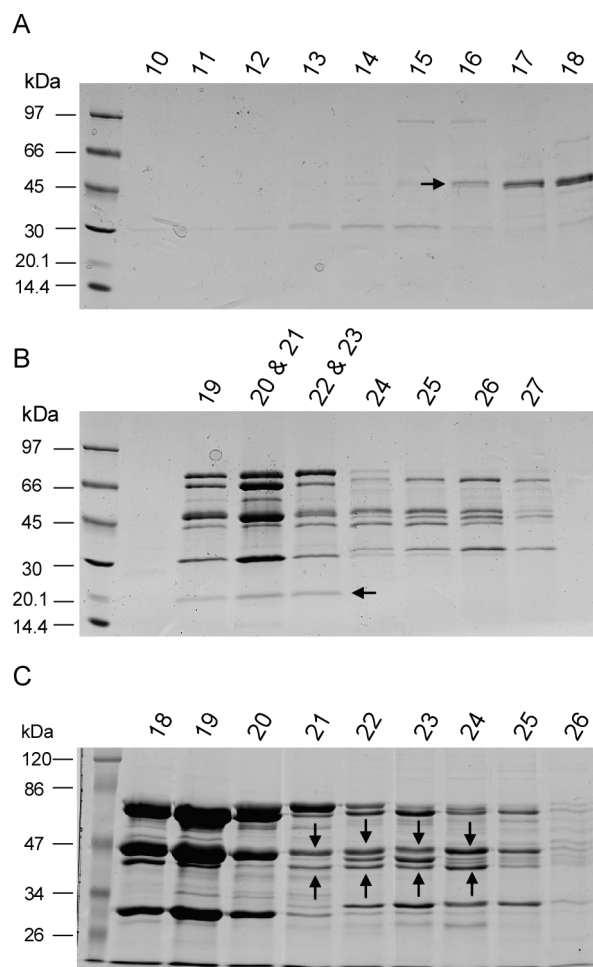
The major sulfate-reducing enzymes were partially purified by anion-exchange chromatography from the Black Sea mats. This allowed the detection of a least one subunit of the enzymes in SDS-PAGE as distinct protein band.



**Fig. 2.** (A) Elution profile of ATP sulfurylase (Sat) and APS reductase (Apr) activities in anion-exchange chromatography (fraction size 5 ml) from the mat sample 328-153. Activity of Sat (grey bars) and Apr (black bars), relative absorption at 280 nm (x) and NaCl concentration (---). (B) Elution profile of dissimilatory sulfite reductase (Dsr) in a separate run of anion-exchange chromatography (fraction size 4.5 ml) from the mat sample 328-153.

One prominent Sat activity-peak was detected in the anion-exchange chromatography of sample 328-153. The fractions 16–19 at 0.25–0.32 M NaCl contained 5 U total activity (Fig. 2), which means that half of the total Sat activity in the soluble fraction was recovered. SDS-PAGE of the major Sat fractions (16–18) revealed protein bands of ~50-kDa (Fig. 3), whose size is similar to those of homotrimeric dissimilatory Sat (Sperling et al., 1998). The active fractions contained 1.7 % of the total soluble mat protein, which is a very high percentage, considered that Dsr, usually the most abundant of the three enzymes of the sulfate-reducing pathway, made up approximately 2 % of the cell protein of a pure culture (Kobayashi et al., 1975; Seki et al., 1985). N-terminal amino-acid sequencing indicated the 50-kDa protein is homologous to known bacterial Sat enzymes (Fig. 5). Although Sat appeared as double band on the SDS-PAGE (Fig. 3), we analyzed the sequence of

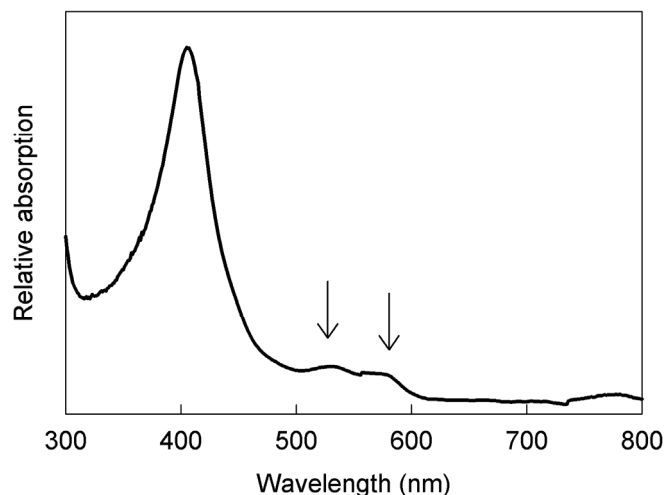
both bands together and obtained only one major amino acid sequence. This suggests that the major protein is a homomultimer, and part of which was likely degraded to a smaller fragment, as reported on the purification of Sat from *Archaeoglobus fulgidus* (Sperling et al., 1998). Alternatively, it might be that two very similar Sat proteins of slightly different size were purified, as one ambiguous amino acid residue in each sequence indicates (Fig. 5). These proteins could belong to two different, closely related SRB.



**Fig. 3.** Protein profile of the anion-exchange chromatography fractions from the mat sample 328-153 (Fig. 2) analyzed by SDS-PAGE. (A) ATP sulfurylase (Sat, ca. 50 kDa), (B) APS reductase beta subunit (AprB, ca. 20 kDa) and (C) dissimilatory sulfite reductase (DsrA, ca. 47 kDa, DsrB, ca. 43 kDa), from a different purification (Fig. 3 inset). Numbers depicted above the gels correspond to the fraction numbers of anion-exchange chromatography in Fig. 2. Major bands of approximately 65 kDa, 45 kDa and 30 kDa in fractions 19-23 (B) and 18-25 (C) are Methyl-coenzyme M reductase (Mcr), alpha-, beta- and gamma subunit, respectively.

The total Apr activity of the Black Sea mat 328-153 was decreased by ammonium sulfate precipitation and following desalting from 280 U to 60 U. No Apr activity was detected in the ammonium-sulfate precipitated fraction and the total protein was not lost by these treatments, suggesting that the Apr in this sample was partially inactivated during ammonium sulfate precipitation and desalting. The fractions 20–23 at 0.33–0.38 M NaCl exhibited 22 U total Apr activity (Fig. 2), which is more than 80 % of Apr activity applied on the anion exchange chromatography. Apr from the SRB and *Archaeoglobus* is a heterodimer composed of one  $\alpha$ -subunit of ~70-Da size (AprA) and a  $\beta$ -subunit of ~20 kDa size (AprB) (Fritz et al., 2000; Fritz et al., 2002). The N-terminal amino-acid sequence analysis indicated that the ~20-kDa protein in the fractions is homologous to the bacterial AprB (Fig. 6). Because the AprA overlapped with the  $\alpha$ -subunit of Mcr in these fractions, its the N-terminal amino-acid sequence could not be determined.

Purification of Dsr was performed independently using the sample 328-153. Dsr eluted after the main absorption peak containing Mcr and Apr at 0.35 M NaCl (Fig. 2). Almost all activity of Dsr (31 mU) was found in the fractions 19–25 as a single activity peak. The total amount in these fractions was 5-fold higher than that in the soluble fraction (see above). The fractions contained ~43 kDa and ~47 kDa protein bands, which are similar to the size of the  $\alpha$ - and  $\beta$ -subunit of Dsr (DsrA and DsrB, respectively) (Fig. 3). The intensity of these bands relative to those of Mcr indicates that they contain a major protein. The small  $\gamma$ -subunit (Arendsen et al., 1993) was not detected. For DsrA and DsrB, only short N-terminal sequences were analyzed, nonetheless the sequence comparison clearly revealed homology with the Dsr from SRB (Fig. 5). The N-terminal sequences contained some ambiguous positions, indicating that the Dsr was not homogenous. It might be a mixture of several Dsr from Deltaproteobacteria. Alternatively, the bands could may contain other proteins of similar sizes, such as Mcr. UV-VIS spectrum of yellow and greenish fraction 24 was recorded, which indicated an absorption maximum at 406 nm and a second maximum at 535 nm as well as a shoulder at 582 nm. This spectrum suggests the presence of a siroheme of a desulforubidin-type (Arendsen et al., 1993) in that fraction in addition to the absorption of the  $F_{430}$  bound to Mcr (Fig. 4).



**Fig. 4.** UV-VIS spectrum of the anion-exchange chromatography fraction 24 containing dissimilatory sulfite reductase (Dsr) and methyl-coenzyme M reductase (Mcr) (Fig. 3B). Arrows indicate a peak at 535 nm and its shoulder at 582 nm, which suggest the presence of a siroheme of a desulforubidin-type (Arendsen *et al.* 1993). The spectrum contains a strong peak at 406 nm, which is corresponding to the absorption of F<sub>430</sub> bound to Mcr, overlapping with the siroheme absorption maximum at 398 nm.

#### *Phylogeny of the sulfate-reducing enzymes*

The obtained N-terminal amino acid sequences were compared with known sequences of enzymes from sulfate-reducing prokaryotes. Noticeably, the N-termini obtained for Sat and Apr from sample 328-153 (20 amino acids sequenced) are identical to the ones obtained from sample P744 (Fig. 5) (37 and 50 amino acids sequenced, data not shown completely), thus the proteins from both mat samples are very similar or identical. DsrAB was only purified from sample 328-153. Obviously, the N-terminal sequence of all three proteins are more similar to sequences from sulfate-reducing organisms of the class Deltaproteobacteria (Fig. 5) than to the sequences of the Gram-positive SRB *D. reducens* or to the sequence of *A. fulgidus*, which is an indication that these enzymes might originate from Deltaproteobacteria rather than from archaea.



Degenerate primer sets specific for the obtained N-terminal AprB sequence were designed in order to assess full length sequences of *aprB* and *aprA* by PCR. From the samples 328-153 and P744, five clones were obtained by PCR, whose N-terminus of the deduced AprB sequence was identical with the N-terminal amino acid sequence determined for the major AprB from the Black Sea microbial mats downstream of the primer region. Additionally, clones were sequenced which do not completely match the N-terminus but are very similar in Apr sequence (data not shown), indicating some microdiversity of Apr on the genetic level. The translated AprBA protein sequences of the five clones identical with the dominant AprB were aligned to known AprBA sequences in a common AprBA alignment and a phylogenetic tree was constructed (Fig. 6). The overall topology of the tree is similar to that of AprB and AprA phylogenetic trees from earlier studies (Friedrich, 2002; Meyer and Küver, 2007). The *Desulfosarcina-Desulfococcus* cluster can be split into six separate lineages which can not be resolved further. It consists of (1) *Desulfococcus* spp. / *Desulfonema limicola* (2) *Desulfonema magnum* / *Olavius symbiont Delta-1* (3) *Desulfosarcina* spp. (4) *Desulfobacterium indolicum* and (5) *Desulfatibacillum* spp. The sixth separate lineage is comprised by all protein sequences matching the N-terminal amino acid sequence of the abundant AprBA from the Black Sea microbial mats; this means that the major Apr from the Black Sea microbial mats forms a subcluster within the *Desulfosarcina-Desulfococcus* cluster. Therefore its phylogenetic position is similar to those of SEEP-SRB1, the SRB associated with ANME; in the 16S rRNA gene tree (Orphan et al., 2001b; Knittel et al., 2003), which indicates that the major Apr from the mats might belong to them.

The amino-acid sequences of the isolated proteins attribute them to the enzymes of Deltaproteobacteria rather than to the enzymes of gram-positive sulfate-reducing bacteria or *Archaeoglobus*. It cannot be excluded that the genes of the examined enzymes were transferred laterally from the SRB to ANME archaea, especially as AOM is considered to be an ancient process (Birgel et al., 2008). However, as yet there's no example of lateral gene transfer of *aprBA* from or to *Desulfosarcina-Desulfococcus* cluster known.



*Implications for anaerobic methane oxidation / Conclusions*

We have identified only one major ATP sulfurylase, APS reductase and dissimilatory sulfite reductase in the Black Sea microbial mats. The enzyme activities in the cell-free extract indicate that all methane-derived reducing equivalents might be channeled via Sat, Apr and Dsr. Their N-terminal amino acid sequence assigned them to bacterial proteins. The phylogenetic position of the respective AprBA protein even originates within the *Desulfosarcina/Desulfococcus* group, similar to the position of the putative AOM-syntrophic SRB in the 16S rRNA gene phylogenetic tree (Orphan et al., 2001b; Knittel et al., 2003). These findings suggest that the identified enzymes are produced by sulfate-reducing Deltaproteobacteria in the mat. Therefore SRB in the Black Sea mats might perform the sulfate reduction with methane-derived reducing equivalents as syntrophic partners of ANME. Recent results also support that hypothesis. AOM-associated SRB only assimilate  $^{13}\text{C}$  from  $^{13}\text{CO}_2$ , and only in the presence of (unlabeled) methane (Wegener et al., 2008), and there is as yet no evidence for a the genes of a dissimilatory sulfate-reducing pathway in the metagenome of ANME-1 (Meyerdierks, unpublished data), and no evidence for further proteins as abundant as Sat, Apr, Dsr and Mcr in the cell extracts of Black Sea microbial mats.

But of course it cannot be excluded that the identified enzymes for sulfate reduction are of bacterial origin, but are produced by ANME. One could assume that the genes of the examined enzymes were transferred laterally from the sulfate-reducing Deltaproteobacteria to ANME archaea, although there is no example of lateral gene transfer of AprBA from or to *Desulfosarcina-Desulfococcus* cluster known. Direct evidence for a linkage between the 16S rRNA of the presumed ANME partners and the major sulfate-reducing enzymes could be obtained by pure culture studies or a combination of fluorescence-in-situ-hybridization and immunological localization of the proteins *in situ* (Milučká et al. in preparation).

This study is one of the few examples of protein purification direct from the environment (Renosto et al., 1991) and revealed the potential of “meta-biochemical” studies on enzymes from environmental samples to attribute functions to specific groups of microorganisms. Purification of yet unknown major enzymes from AOM-performing Black Sea microbial mats might as well shed light on the syntrophic interactions between ANME and their sulfate reducing bacterial partners.



## Experimental procedures

### *Sampling of microbial mats and cultivation*

Microbial mats were collected in methane seep areas in the northwestern Black Sea at 220 m water depth during RV Poseidon cruise POS 317-2 in August 2004 (Project GHOSTDABS, University of Hamburg) at 44° 46' N, 31° 60' E (here referred to as sample P744), and during RV Meteor cruise M72/2 in February/March 2007 (Project MUMM, Max-Planck-Institute for Marine Microbiology, Bremen) at 44° 46' 31" N, 31° 59' 25"E (referred to as sample 328-153). The mat pieces were stored in anoxic jars containing anoxic seawater at 6°C until further processing. In the laboratory, the mat samples were incubated under a pure methane atmosphere (1 bar overpressure) at 12°C in artificial sea water medium (Widdel and Bak, 1992) supplemented with bicarbonate (30 mM), ammonium (4.7 mM), phosphate (1.5 mM), trace elements, vitamins, and sulfide (0.5 mM) as reductant.

In the laboratory, the mat samples were incubated under a pure methane atmosphere (1 bar overpressure) at 12°C in artificial sea water medium supplemented with bicarbonate (30 mM), ammonium (4.7 mM), phosphate (1.5 mM), trace elements and vitamins, reduced with sulfide (0.5 mM), as used for the cultivation of SRB (Widdel and Bak, 1992). Strains of SRB were obtained from German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (DSMZ, Braunschweig). *Desulfosarcina variabilis* (DSM 2060) and *Desulfobacterium autotrophicum* strain HRM2 (DSM 3382) were also grown in artificial sea water media at 28°C. *D. variabilis* was supplied with 5 mM benzoate as electron donor. *D. autotrophicum* strain HRM2 was grown chemolithoautotrophically in an H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (80%/20% v/v) atmosphere. For the cultivation of *Desulfococcus multivorans* (DSM 2059) the salt content was reduced to 120 mM NaCl, 21.1 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and 6.4 mM MgCl<sub>2</sub>, and 5 mM acetate was supplied as substrate.

### *Incubation experiments*

Incubation experiments with Black Sea microbial mats were performed in glass tubes sealed with butyl rubber stoppers. Microbial mats were homogenized using a 15 ml tissue grinder (Wheaton) and resuspended in artificial seawater medium. Final volume of 10 ml slurry was transferred to the glass tubes. The headspace in the glass tubes contained either methane (100%, 1 bar overpressure) or nitrogen/carbon dioxide (90%/10% v/v). All manipulations were performed under anoxic conditions in an anoxic glove chamber (Mecaplex, Grenchen, Switzerland) with a nitrogen/carbon dioxide (90%/10% v/v) atmosphere. Substrates were added from sterile and anoxic stock solutions with syringes pre-flushed with nitrogen.

### *Analyses*

Sulfide production was determined as formation of colloidal copper sulfide according to Cord-Ruwisch (1985) or by the methylene blue formation reaction (Cline, 1969).

Methane was determined using a GC14B gas chromatograph (Shimadzu, Kyoto, Japan) equipped with a Supel-Q Plot column (30 m x 0.53 mm; Supelco) and a flame ionization detector. The carrier gas was N<sub>2</sub> at a flow rate of 3 ml min<sup>-1</sup>. The column temperature was 110 °C.

Wet weight of mat samples was determined after removal of medium by centrifugation. Dry weight of mat pieces was determined after incubation at 80° C for 48 hours.

### *Fluorescence in situ hybridization*

Mat samples were homogenized using a 15 ml tissue grinder (Wheaton Science Products, Milville, USA). Homogenized mats were fixed in 2 % formaldehyde for 12 hours, washed with 1x phosphate buffered saline (7 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 3 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 130 mM NaCl) and finally stored in PBS/EtOH (1:1) at -20 °C. Stored samples were diluted in PBS and filtered on 0.2-mm polycarbonate filters (GTTP, Millipore, Eschborn, Germany). Hybridization; staining with 4',6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI) and microscopy was performed as described previously (Amann et al., 1995). The applied probes and formamide (FA) concentrations were for negative control NON338, 10 % FA (Wallner et al., 1993); for archaea Arch915, 35% FA (Amann et al., 1990), for eubacteria EUBI-III, 35% FA (Daims et al., 1999), for *Desulfosarcina / Desulfococcus* DSS658, 50% FA (Manz et al., 1998), for ANME-1 ANME-1 350 40% (Boetius et al., 2000), for ANME-2 ANME-2 538, 50 % FA (Treude et al., 2005). Cy3- or carboxyfluorescein- (FLUOS-) labeled probes were obtained from ThermoHybaid (Ulm, Germany).

### *Protein purification*

Cells of pure cultures were harvested by centrifugation at 17,000 × g for 25 min and washed with 50 mM MOPS-KOH pH 7.0 supplemented with the respective NaCl and MgCl<sub>2</sub> concentrations of the growth medium. Cells were resuspended in 50 mM MOPS-KOH pH 7.0. Black Sea microbial mats were cut in small pieces, homogenized and resuspended in 50 mM MOPS-KOH pH 7.0. Cells of pure cultures and microbial mats were disrupted by sonication (80 Watt, 10-25 min, depending on amount of cells) on ice. Cell debris and carbonate precipitates were removed by centrifugation at 18,000 × g for 20 min. All steps were performed under anoxic conditions.

Protein content was determined as described by Bradford (1976). The crude extract contained approximately 15-20 mg protein per g of wet weight microbial mats and 40 mg protein per g of wet weight cells in case of pure cultures.

The crude extract of the microbial mats was subjected to ultracentrifugation at  $150,000 \times g$  for one hour. To visualize the protein bands in SDS-PAGE, it was required for some mat samples to remove unknown substances involved in the mat sample, which interfered with the SDS-PAGE analysis of the protein by smearing the protein band (data not shown). Therefore supernatant was treated with  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (20% saturation) before anion-exchange chromatography and precipitates were removed by centrifugation at  $18,000 \times g$  for 20 min. After desalting, the soluble proteins were applied to a Q-Sepharose high performance anion exchange chromatography column (HiTrap Q HP, 5 ml, GE Healthcare, Freiburg, Germany), which was equilibrated with 50 mM MOPS-KOH pH 7. Proteins were eluted with a linearly increasing gradient of 0-0.6 M NaCl. All steps of sonication, centrifugation and chromatography were performed under anoxic conditions at 18°C (Sat, Apr) or 8°C (Dsr). Fractions were collected and proteins were analyzed by sodium dodecylsulfate polyacrylamid gel electrophoresis (SDS-PAGE) followed by staining with Coomassie Blue G-250. For amino acid sequence determination, proteins were blotted on a PVDF membrane using wet blot (BioRad) according to manufacturer's instructions. The protein bands were excised and subjected to N-terminal amino acid sequencing by Protein Analytics (Giessen, Germany).

### *Enzyme assays*

ATP sulfurylase activity was determined as ATP formation in a coupled spectrophotometric assay according to Dahl&Trüper (Dahl and Trüper, 1994), with the only modification that Tris-HCl pH 7.5 was used as buffer. One U is defined as 1  $\mu\text{mol}$  ATP formed from APS per minute.

APS reductase activity was determined as oxidation of sulfite with concomitant reduction of  $\text{K}_3(\text{Fe}[\text{CN}]_6)$  (Kobayashi et al., 1975), in 50 mM Tris-HCl pH 7.5. The abiotic reduction of  $\text{K}_3(\text{Fe}[\text{CN}]_6)$  by sulfite was determined and subtracted. One U is defined as 1  $\mu\text{mol}$  APS formed from AMP per minute.

Dissimilatory sulfite reductase activity was determined according to Dahl and Trüper (2001) in an anoxic glove box with pure  $\text{N}_2$  atmosphere. Methylviologen was reduced with dithionite (Frederiksen and Finster, 2003) and absorption of methylviologen was recorded at 578 nm ( $\epsilon_{578} = 9.7 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). The unspecific oxidation of methylviologen was finished by pre-incubation for 30-60 min in the presence of the enzyme. One U is defined as 1  $\mu\text{mol}$  sulfite reduced per minute.

*DNA manipulation and analysis*

Genomic DNA of Black Sea microbial mats and pure cultures of SRB was extracted according to the genomic tip protocol (Genomic DNA handbook, Quiagen, Hilden, Germany). Polymerase chain reaction (PCR) was used to amplify *aprBA*, the corresponding gene coding for APS reductase. The degenerated primer BS-AprB-1-F (5' ATG CCD AGT TAT GTH ATH AC 3') was newly designed based on the N-terminal amino acid sequence of the analyzed AprB protein from the microbial mat. Amplification of *aprBA* was performed using primer combinations BS-AprB-1-F/AprA-5-RV and AprA-1-FW/ AprA-10RV (Meyer and Küver, 2007), as well as BS-AprB-1-FW/AprA-10-RV, the latter yielding almost full-length *aprBA* sequences. Optimal primer annealing was achieved at 53°C. PCR products were purified using the Qiaquick PCR purification kit (Qiagen). Clone libraries were constructed using the TOPO pCR4 vector (TOPO TA cloning kit, Invitrogen, Karlsruhe, Germany) following manufacturer's instructions. PCR products were sequenced using the ABI BigDye terminator cycle sequencing kit (Applied Biosystems). Sequence analysis was performed using the Lasergene software package (DNASTar, GATC Biotech, Konstanz, Germany) or the Bioedit sequence alignment editor version 7.0.9.0 (Hall, 1999). Sequences used for comparison of N-terminal amino acids (Fig.6) were Black Sea microbial mats (sample P744), Black Sea microbial mats (sample 153-328), *Desulfatibacillum alkenivorans* strain AK-01 (ZP\_02131628.1), *Desulfococcus oleovorans* strain HxD3 (ABW66812.1), *Desulfobacterium autotrophicum* strain HRM2 (YP\_002604365), *Desulfovibrio desulfuricans* strain G20 (YP\_388757.1), *Desulfotomaculum reducens* strain MI-1 (ABO49175.1), *Archaeoglobus fulgidus* (AAB89581.1). For AprB) BS Black Sea microbial mats (sample P744), Black Sea microbial mats (sample 153-328), *Desulfatibacillum alkenivorans* strain AK-01 (YP\_002430736), *Desulfococcus oleovorans* strain HxD3 (YP\_001528884), *Desulfobacterium autotrophicum* strain HRM2 (YP\_002601731), *Desulfovibrio desulfuricans* strain G20 (YP\_387605), *Desulfotomaculum reducens* strain MI-1 (YP\_001112001), *Archaeoglobus fulgidus* (NP\_070497). For DsrA) Black Sea microbial mats (sample 153-328), *Desulfatibacillum alkenivorans* strain AK-01 (YP\_002433449.1), *Desulfococcus oleovorans* strain HxD3 (ABW68472.1), *Desulfobacterium autotrophicum* strain HRM2 (YP\_002605460.1), *Desulfovibrio desulfuricans* strain G20 (ABB37327.1), *Desulfotomaculum reducens* strain MI-1 (YP\_001114514.1), *Archaeoglobus fulgidus* (NP\_069259.1). For DsrB) Black Sea microbial mats (sample 153-328), *Desulfatibacillum alkenivorans* strain AK-01 (YP\_002433448.1), *Desulfococcus oleovorans* strain HxD3 (YP\_001530550.1), *Desulfobacterium autotrophicum* strain HRM2 (ACN17295.1), *Desulfovibrio desulfuricans* strain G20 (ABB37328.1), *Desulfotomaculum reducens* strain MI-1 (YP\_001114513.1), *Archaeoglobus fulgidus* (NP\_069260.1).

Sequences of AprB and AprA were analyzed together using the ClustalW alignment and the phylogenetic trees were constructed using the PhyML program (maximum likelihood method, <http://atgc.lirmm.fr/phyml>, 100 bootstraps) as indicated previously (Meyer and Küver, 2007).

### *Nucleotide sequence accession numbers*

The *aprBA* nucleotide sequence data reported in this article appear in the EMBL, GenBank and DDBJ sequence database under the Accession No. **X and Y** for AprBA from Black Sea microbial mats P744 clone 18 and B1, respectively, **X-Y** Black Sea microbial mats 328-153 clone 2-4, **A** for *Desulfosarcina ovata* strain oxyS1, **B** for *Desulfosarcina cetonica*.

### **Acknowledgements**

We are indebted to Rolf Thauer for continuous advice and support, and to Walter Michaelis, Richard Seifert, and Antje Boetius for access to samples. We thank the crews of RV Poseidon with JAGO, and RV Meteor with ROV QUEST (MARUM) for help during field work, Thomas Holler for sample collection, and Daniela Lange and Alexander Galushko for providing strains. This work was supported by the Max Planck Society, the Fonds der Chemischen Industrie, and the projects MUMM, GHOSTDABS (program GEOTECHNOLOGIEN of the BMBF and DFG) and BEBOP (University of Hamburg). Seigo Shima received support from an emeritus grant (Max Planck Society) given to Rolf Thauer. This is publication number **00000** in the framework of MUMM II (program GEOTECHNOLOGIEN).

## References

- Amann, R.I., Krumholz, L., and Stahl, D.A. (1990) Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental studies in microbiology. *J Bacteriol* **172**: 762–770.
- Amann, R.I., Ludwig, W., and Schleifer, K.H. (1995) Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev* **59**: 143–169.
- Arendsen, A.F., Verhagen, M.F.J.M., Wolbert, R.B.G., Pierik, A.J., Stams, A.J.M., Jetten, M.S.M., and Hagen, W.R. (1993) The dissimilatory sulfite reductase from *Desulfosarcina variabilis* is a desulforubidin containing uncoupled metalated sirohemes and S = <sup>9</sup>/<sub>2</sub> iron-sulfur clusters. *Biochemistry* **32**: 10323–10330.
- Birgel, D., Himmler, T., Freiwald, A., and Peckmann, J. (2008) A new constraint on the antiquity of anaerobic oxidation of methane: Late Pennsylvanian seep limestones from southern Namibia. *Geology* **36**: 543–546.
- Blumenberg, M., Seifert, R., Reitner, J., Pape, T., and Michaelis, W. (2004) Membrane lipid patterns typify distinct anaerobic methanotrophic consortia. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**: 11111–11116.
- Boetius, A., Ravensschlag, K., Schubert, C.J., Rickert, D., Widdel, F., Giesecke, A. et al. (2000) A marine microbial consortium apparently mediating anaerobic oxidation of methane. *Nature* **407**: 623–626.
- Bradford, M.M. (1976) Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248–254.
- Cline, J.D. (1969) Spectrophotometric determination of hydrogen sulfide in natural waters. *Limnol Oceanogr* **14**: 454–458.
- Cord-Ruwisch, R. (1985) A quick method for the determination of dissolved and precipitated sulfides in cultures of sulfate-reducing bacteria. *J Microbiol Methods* **4**: 33–36.
- Dahl, C., and Trüper, H.G. (1994) Enzymes of dissimilatory sulfide oxidation in phototrophic bacteria. *Method Enzymol* **243**: 400–421.
- Dahl, C., and Trüper, H.G. (2001) Sulfite reductase and APS reductase from *Archaeoglobus fulgidus*. *Method. Enzymol.* **331**: 427–441.
- Dahl, C., Speich, N., and Trüper, H.G. (1994) Enzymology and molecular biology of sulfate reduction in extremely thermophilic archaeon *Archaeoglobus fulgidus*. *Method Enzymol* **243**: 331–349.
- Daims, H., Brühl, A., Amann, R., and Schleifer, K.H. (1999) The domain-specific probe EUB338 is insufficient for the detection of all bacteria: development and evaluation of a more comprehensive probe set. *Syst Appl Microbiol* **22**: 434–444.

- Felbeck, H., Childress, J.J., and Somero, G.N. (1981) Calvin-Benson cycle and sulphide oxidation enzymes in animals from sulfide-rich habitats. *Nature* **293**: 291–293.
- Frederiksen, T.M., and Finster, K. (2003) Sulfite-oxido-reductase is involved in the oxidation of sulfite in *Desulfocapsa sulfoexigens* during disproportionation of thiosulfate and elemental sulfur. *Biodegradation* **14**: 189–198.
- Friedrich, M.W. (2002) Phylogenetic analysis reveals multiple lateral transfers of adenosine-5'-phosphosulfate reductase genes among sulfate-reducing microorganisms. *J Bacteriol* **184**: 278–289.
- Fritz, G., Büchert, T., Huber, H., Stetter, K.O., and Kroneck, P.M.H. (2000) Adenylylsulfate reductases from archaea and bacteria are 1 : 1 alpha beta-heterodimeric iron-sulfur flavoenzymes - high similarity of molecular properties emphasizes their central role in sulfur metabolism. *FEBS Lett* **473**: 63–66.
- Fritz, G., Roth, A., Schiffer, A., Büchert, T., Bourenkov, G., Bartunik, H.D. et al. (2002) Structure of adenylylsulfate reductase from the hyperthermophilic *Archaeoglobus fulgidus* at 1.6 Å resolution. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 1836–1841.
- Hall, T.A. (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids S*: 95–98.
- Hallam, S.J., Putnam, N., Preston, C.M., Detter, J.C., Rokhsar, D., Richardson, P.M., and DeLong, E.F. (2004) Reverse methanogenesis: Testing the hypothesis with environmental genomics. *Science* **305**: 1457–1462.
- Harder, J. (1997) Anaerobic methane oxidation by bacteria employing <sup>14</sup>C-methane uncontaminated with <sup>14</sup>C-carbon monoxide. *Mar Geology* **137**: 13–23.
- Heller, C., Hoppert, M., and Reitner, J. (2008) Immunological localization of coenzyme M reductase in anaerobic methane-oxidizing archaea of ANME 1 and ANME 2 type. *Geomicrobiol J* **25**: 149–156.
- Hoehler, T.M., Alperin, M.J., Albert, D.B., and Martens, C.S. (1994) Field and laboratory studies of methane oxidation in an anoxic marine sediment - evidence for a methanogen-sulfate reducer consortium. *Glob Biogeochem Cycles* **8**: 451–463.
- Knittel, K., Lösekann, T., Boetius, A., Kort, R., and Amann, R. (2005) Diversity and distribution of methanotrophic archaea at cold seeps. *Appl Environ Microbiol* **71**: 467–479.
- Knittel, K., Boetius, A., Lemke, A., Eilers, H., Lochte, K., Pfannkuche, O. et al. (2003) Activity, distribution, and diversity of sulfate reducers and other bacteria in sediments above gas hydrate (Cascadia margin, Oregon). *Geomicrobiol J* **20**: 269–294.
- Kobayashi, K., Morisawa, Y., Ishituka, T., and Ishimoto, M. (1975) Biochemical studies on sulfate-reducing bacteria. 14. Enzyme levels of adenylylsulfate reductase, inorganic pyrophosphatase, sulfite reductase, hydrogenase, and adenosine-triphosphatase in cells grown on sulfate, sulfite, and thiosulfate. *J Biochem* **78**: 1079–1085.

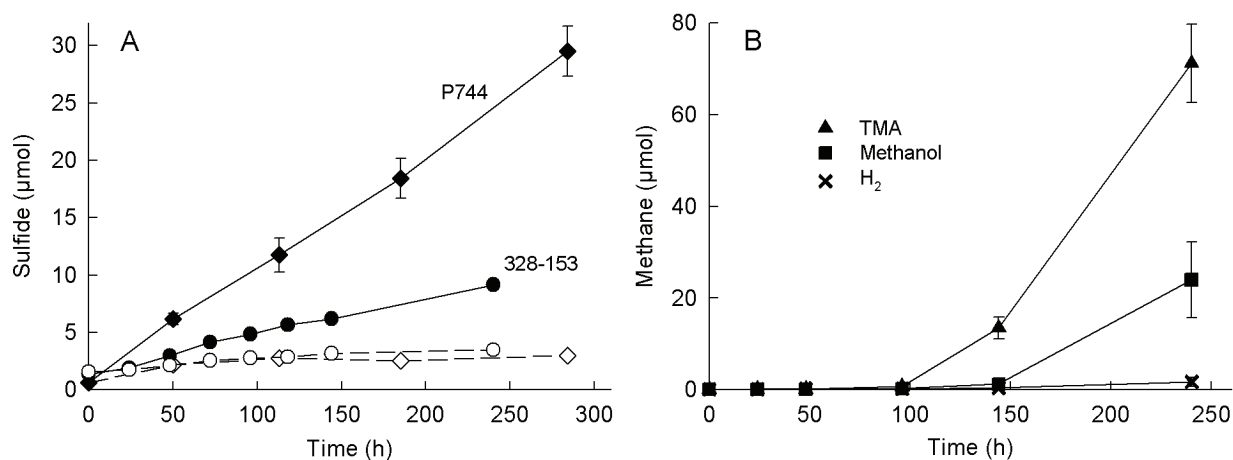
- Krämer, M., and Cypionka, H. (1989) Sulfate formation via ATP sulfurylase in thiosulfate-disproportionating and sulfite-disproportionating bacteria. *Arch Microbiol* **151**: 232–237.
- Krüger, M., Blumenberg, M., Kasten, S., Wieland, A., Känel, L., Klock, J.H. et al. (2008) A novel, multi-layered methanotrophic microbial mat system growing on the sediment of the Black Sea. *Environ Microbiol* **10**: 1934–1947.
- Krüger, M., Meyerdierks, A., Glöckner, F.O., Amann, R., Widdel, F., Kube, M. et al. (2003) A conspicuous nickel protein in microbial mats that oxidize methane anaerobically. *Nature* **426**: 878–881.
- Lee, J.P., Legall, J., and Peck, H.D. (1973) Isolation of assimilatory-type and dissimilatory-type sulfite reductases from *Desulfovibrio vulgaris*. *J Bacteriol* **115**: 529–542.
- Lösekann, T., Knittel, K., Nadalig, T., Fuchs, B., Niemann, H., Boetius, A., and Amann, R. (2007) Diversity and abundance of aerobic and anaerobic methane oxidizers at the Haakon Mosby mud volcano, Barents Sea. *Appl Environ Microbiol* **73**: 3348–3362.
- Manz, W., Eisenbrecher, M., Neu, T.R., and Szewzyk, U. (1998) Abundance and spatial organization of gram-negative sulfate-reducing bacteria in activated sludge investigated by in situ probing with specific 16S rRNA targeted oligonucleotides. *FEMS Microbiol Ecol* **25**: 43–61.
- Meyer, B., and Küver, J. (2007) Phylogeny of the alpha and beta subunits of the dissimilatory adenosine-5'-phosphosulfate (APS) reductase from sulfate-reducing prokaryotes - origin and evolution of the dissimilatory sulfate-reduction pathway. *Microbiol-SGM* **153**: 2026–2044.
- Meyerdierks, A., Kube, M., Lombardot, T., Knittel, K., Bauer, M., Glöckner, F.O. et al. (2005) Insights into the genomes of archaea mediating the anaerobic oxidation of methane. *Environ Microbiol* **7**: 1937–1951.
- Michaelis, W., Seifert, R., Nauhaus, K., Treude, T., Thiel, V., Blumenberg, M. et al. (2002) Microbial reefs in the Black Sea fueled by anaerobic oxidation of methane. *Science* **297**: 1013–1015.
- Nauhaus, K., Boetius, A., Krüger, M., and Widdel, F. (2002) *In vitro* demonstration of anaerobic oxidation of methane coupled to sulphate reduction in sediment from a marine gas hydrate area. *Environ Microbiol* **4**: 296–305.
- Nauhaus, K., Treude, T., Boetius, A., and Krüger, M. (2005) Environmental regulation of the anaerobic oxidation of methane: a comparison of ANME-I and ANME-II communities. *Environ Microbiol* **7**: 98–106.
- Nauhaus, K., Albrecht, M., Elvert, M., Boetius, A., and Widdel, F. (2007) *In vitro* cell growth of marine archaeal-bacterial consortia during anaerobic oxidation of methane with sulfate. *Environ Microbiol* **9**: 187–196.



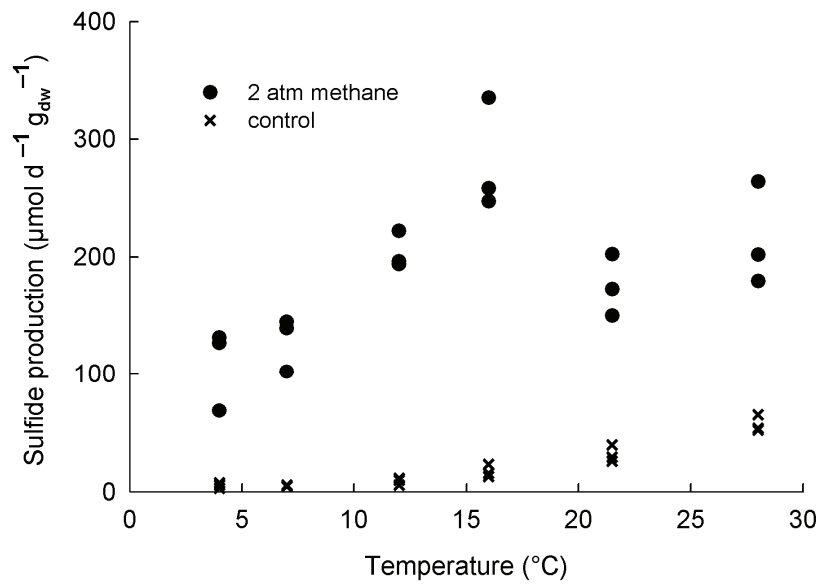
- Orcutt, B., Boetius, A., Elvert, M., Samarkin, V., and Joye, S.B. (2005) Molecular biogeochemistry of sulfate reduction, methanogenesis and the anaerobic oxidation of methane at Gulf of Mexico cold seeps. *Geochim Cosmochim Acta* **69**: 4267–4281.
- Orphan, V.J., House, C.H., Hinrichs, K.U., McKeegan, K.D., and DeLong, E.F. (2001a) Methane-consuming archaea revealed by directly coupled isotopic and phylogenetic analysis. *Science* **293**: 484–487.
- Orphan, V.J., House, C.H., Hinrichs, K.U., McKeegan, K.D., and DeLong, E.F. (2002) Multiple archaeal groups mediate methane oxidation in anoxic cold seep sediments. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 7663–7668.
- Orphan, V.J., Hinrichs, K.U., Ussler, W., Paull, C.K., Taylor, L.T., Sylva, S.P. et al. (2001b) Comparative analysis of methane-oxidizing archaea and sulfate-reducing bacteria in anoxic marine sediments. *Appl Environ Microbiol* **67**: 1922–1934.
- Oyekola, O., and Pletschke, B. (2006) ATP-sulphurylase: An enzymatic marker for biological sulphate reduction? *Soil Biol Biochem* **38**: 3511–3515.
- Pimenov, N.V., Rusanov, I.I., Poglazova, M.N., Mityushina, L.L., Sorokin, D.Y., Khmelenina, V.N., and Trotsenko, Y.A. (1997) Bacterial mats on coral-like structures at methane seeps in the Black Sea. *Microbiol-SGM* **66**: 354–360.
- Pletschke, B.I., Rose, P.D., and Whiteley, C.G. (2002) The enzymology of sludge solubilisation utilising sulphate reducing systems identification and properties of ATP-sulphurylases. *Enzyme Microb Tech* **31**: 329–336.
- Rabus, R., Hansen, T.A., and Widdel, F. (2006) Dissimilatory sulfate- and sulfur-reducing prokaryotes. In *The Prokaryotes - A handbook on the biology of bacteria*. Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.H., and Stackebrandt, E. (eds): Springer Science + Business Media, Inc., pp. 659–768.
- Reeburgh, W.S. (2007) Oceanic methane biogeochemistry. *Chem Rev* **107**: 486–513.
- Reitner, J., Peckmann, J., Reimer, A., Schumann, G., and Thiel, V. (2005) Methane-derived carbonate build-ups and associated microbial communities at cold seeps on the lower Crimean shelf (Black Sea). *Facies* **51**: 71–84.
- Renosto, F., Martin, R.L., Borrell, J.L., Nelson, D.C., and Segel, I.H. (1991) ATP sulfurylase from trophosome tissue of *Riftia pachyptila* (hydrothermal vent tube worm). *Arch Biochem Biophys* **290**: 66–78.
- Seifert, R., Nauhaus, K., Blumenberg, M., Krüger, M., and Michaelis, W. (2006) Methane dynamics in a microbial community of the Black Sea traced by stable carbon isotopes *in vitro*. *Org Geochem* **37**: 1411–1419.
- Seki, Y., Nagai, Y., and Ishimoto, M. (1985) Characterization of a dissimilatory-type sulfite reductase, desulfoviridin, from *Desulfovibrio africanus* Benghazi. *J Biochem* **98**: 1535–1543.

- Shima, S., and Thauer, R.K. (2005) Methyl-coenzyme M reductase and the anaerobic oxidation of methane in methanotrophic Archaea. *Curr Opin Microbiol* **8**: 643–648.
- Sperling, D., Kappler, U., Wynen, A., Dahl, C., and Trüper, H.G. (1998) Dissimilatory ATP sulfurylase from the hyperthermophilic sulfate reducer *Archaeoglobus fulgidus* belongs to the group of homo-oligomeric ATP sulfurylases. *FEMS Microbiol Lett* **162**: 257–264.
- Stetter, K.O. (1988) *Archaeoglobus fulgidus* gen. nov. sp. nov. - a new taxon of extremely thermophilic archaeobacteria. *Syst Appl Microbiol* **10**: 172–173.
- Thauer, R.K., Kaster, A.K., Seedorf, H., Buckel, W., and Hedderich, R. (2008) Methanogenic archaea: ecologically relevant differences in energy conservation. *Nat Rev Microbiol* **6**: 579–591.
- Treude, T., Knittel, K., Blumenberg, M., Seifert, R., and Boetius, A. (2005) Subsurface microbial methanotrophic mats in the Black Sea. *Appl Environ Microbiol* **71**: 6375–6378.
- Treude, T., Orphan, V., Knittel, K., Gieseke, A., House, C.H., and Boetius, A. (2007) Consumption of methane and CO<sub>2</sub> by methanotrophic microbial mats from gas seeps of the anoxic black sea *Appl Environ Microbiol* **73**: 3770–3770.
- Valentine, D.L., Blanton, D.C., and Reeburgh, W.S. (2000) Hydrogen production by methanogens under low-hydrogen conditions. *Arch Microbiol* **174**: 415–421.
- Wagner, M., Roger, A.J., Flax, J.L., Brusseau, G.A., and Stahl, D.A. (1998) Phylogeny of dissimilatory sulfite reductases supports an early origin of sulfate respiration. *J Bacteriol* **180**: 2975–2982.
- Wallner, G., Amann, R., and Beisker, W. (1993) Optimizing fluorescent in situ hybridization with rRNA-targeted oligonucleotide probes for flow cytometric identification of microorganisms. *Cytometry* **14**: 136–143.
- Wegener, G., Niemann, H., Elvert, M., Hinrichs, K.U., and Boetius, A. (2008) Assimilation of methane and inorganic carbon by microbial communities mediating the anaerobic oxidation of methane. *Environ Microbiol* **10**: 2287–2298.
- Widdel, F., and Bak, F. (1992) Gram-negative mesophilic sulfate-reducing bacteria. In *The Prokaryotes*. Balows, A.T., H.G.; Dworkin, M., Harder, W.; and Schleifer, K.-H. (ed). New York: Springer, pp. 3352–3378.
- Zehnder, A.J.B., and Brock, T.D. (1979) Methane formation and methane oxidation by methanogenic bacteria. *J Bacteriol* **137**: 420–432.

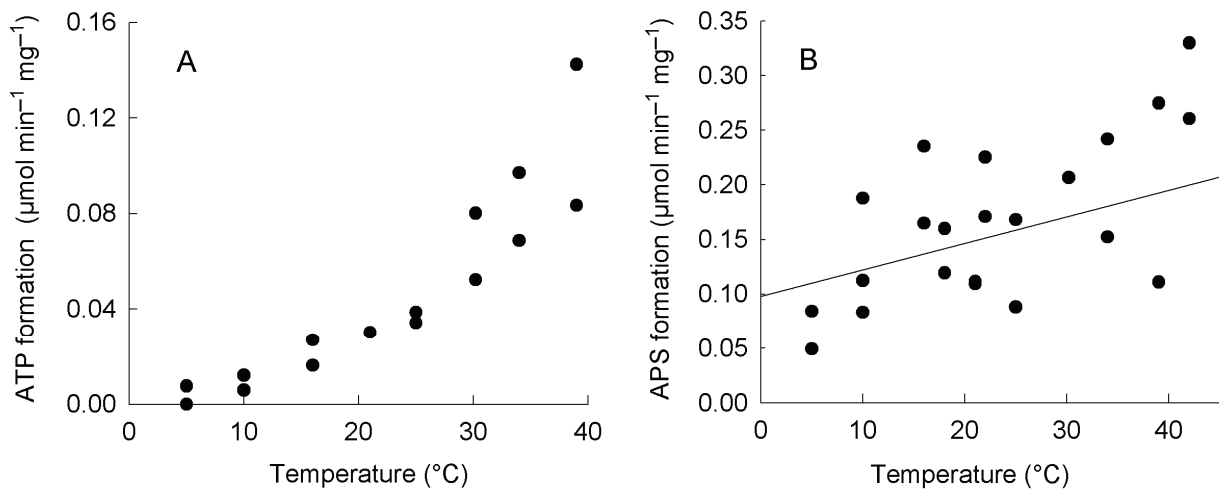
## Supporting Information



**Fig. S1.** Anaerobic methane oxidation coupled to sulfate reduction (A) vs. methanogenesis (B) in homogenized Black Sea microbial mats, sample P744, at 12°C (n=3) and sample 328-153, at 22°C (n=3). (A) Sulfide production from sulfate in sample P744 (◆) and sample 328-153 (●) and respective sulfide production without electron donor supplied (◇, ○). (B) Methanogenesis in sample 328-153 with 5 mM trimethylamine (▲), 10 mM methanol (■) or hydrogen/carbon dioxide (×; 80/20 v/v, 2 atm). Tubes (20 ml) were filled with 10 ml slurry, containing approximately 5 mg biomass of P744 (dry weight) or filled with 9 ml slurry, containing approximately 3 mg biomass of 328-153 (dry weight).



**Fig. S2.** Temperature dependence of sulfate reduction rates in homogenized Black Sea microbial mats with 2 atm methane (●) and control without electron donor (×). Tubes (20 ml) were filled with 9 ml slurry of sample 328-153 (n=3), containing approximately 9 mg biomass (dry weight). Incubation was performed for 24 days in the dark.



**Fig. S3.** Temperature dependence of ATP Sulfurylase (A) and APS reductase (B) specific activities in the cell free extract of Black Sea microbial mats 328-153.

## **F Anhang**

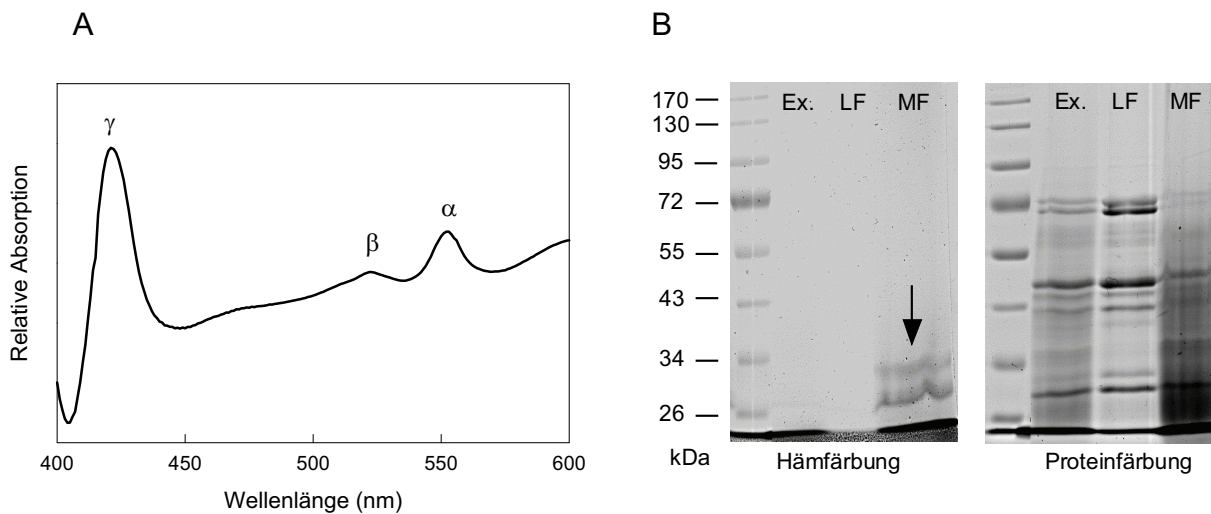
<b>1. Cytochrome in den mikrobiellen Matten aus dem Schwarzen Meer</b>	<b>148</b>
<b>2. Phylogenie der ATP-Sulfurylase (Sat) inklusive neuer Sequenzen</b>	<b>150</b>
<b>3. Experiment zur möglichen Komproportionierung von Sulfid und Sulfat durch <i>Desulfocapsa sulfexigens</i></b>	<b>152</b>
<b>4. Ko-Anreicherung von SRB mit Trimethylamin-abbauenden Methanogenen</b>	<b>154</b>

## 1. Cytochrome in den mikrobiellen Matten aus dem Schwarzen Meer

Bereits eine der ersten Arbeiten über die (pinken) mikrobiellen Matten aus dem Schwarzen Meer berichtete von Cytochromen darin. Der zellfreie Proteinextrakt wies das typische Absorptionsspektrum von Cytochromen, vermutlich von Cytochrom  $c_{552}$ , auf (Pimenov et al. 1997). Hier sollte zunächst ermittelt werden, ob auch die in dieser Arbeit studierten mikrobiellen Matten aus dem Schwarzen Meer Cytochrome enthalten.

Die zellfreien Proteinextrakte der schwarzen mikrobiellen Matten BS P744 und BS 328-153 (Abb. A-1A) zeigten ebenfalls das typische UV-VIS-Differenzspektrum (Dithionit-reduziert minus oxidiert). Die Absorptionsmaxima lagen bei 421 nm ( $\gamma$ -Bande), 522,5 nm ( $\beta$ -Bande) und 552,5 nm ( $\alpha$ -Bande), und waren damit sehr ähnlich denen, die Pimenov et al. (1997) für die pinke Matte ermittelten. Möglicherweise enthalten beide Typen von mikrobiellen Matten also ähnliche Cytochrome. Anhand der Höhe der  $\alpha$ -Bande wurde eine Abschätzung der Cytochrom-Konzentration im Proteinextrakt vorgenommen. Sie betrug bei einem angenommenen Extinktionskoeffizienten von  $32,5 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (Seeliger et al. 1998)  $1,3\text{--}1,6 \text{ nmol mg}_{\text{protein}}^{-1}$ . Dieser Wert liegt in der Größenordnung der Cytochrom-Konzentration im Zellextrakt von Reinkulturen von *Geobacter sulfurreducens* ( $1,2 \text{ nmol mg}^{-1}$ ; Seeliger et al. 1998 bzw.  $7,8\text{--}10,9 \text{ nmol mg}^{-1}$ ; A. Galushko, pers. Mitt.), der in Kultur aufgrund der Cytochrome eine pinke Farbe besitzt und in dessen Genom über 100 Gene für Cytochrome kodieren (Methe et al. 2003). Vergleichsdaten für Archaeen und SRB konnten nicht gefunden werden. Auch der zellfreie Extrakt der ANME-1/DSS dominierten pinken mikrobiellen Matte BS P729 wurde mit  $1,7 \text{ nmol mg}^{-1}$  ein ähnlich hoher Gehalt an Cytochromen ermittelt. Entgegen der Beobachtung von Pimenov et al. (1997), die die Cytochrome hauptsächlich in der Membranfraktion fanden, wurden sie in den in dieser Arbeit durchgeführten Zellaufschlüssen (Abschnitt B.3.1) meistens etwa zu gleichen Anteilen in der löslichen Proteinfraction ( $150.000 \times g$ ) und in der Membranfraktion (Pellet  $150.000 \times g$ ) beobachtet. Nur in einem Zellaufschluss fanden sich nahezu alle Cytochrom in der Membranfraktion. Dies spricht dafür, dass zumindest ein Teil der Cytochrome nicht membranständig, sondern nur Membran-assoziiert war und durch den Zellaufschluss bzw. die anschließenden Zentrifugationsschritte von der Membran abgelöst wurde. Da  $b$ -Typ-Cytochrome Bestandteile integraler Membranproteine sind, während  $c$ -Typ-Cytochrome z.B. bei Sulfatreduzierern auch Membran-assoziiert vorkommen (Jones & Poole 1985; Matias et al. 2005), deutet dies abermals auf darauf hin, dass die abundanten Cytochrome in den mikrobiellen Matten vom  $c$ -Typ sind. Eine Separierung der  $b$ - und  $c$ -Typ-Cytochrome mit

nachfolgender Detektion der Hämgruppen als Pyridin-Hämochrome (Basford et al. 1957) ist geplant.



**Abbildung A-1.** (A) Differenzspektrum (Dithionit-reduziert minus oxidiert) des Proteinextraktes der schwarzen mikrobiellen Matte BS 328-153. Die Absorptionsmaxima entsprechen der  $\gamma$ -,  $\beta$ - und  $\alpha$ -Bande im Differenzspektrum von Cytochromen. (B) Links: Detektion der Proteine mit kovalent gebundenen Hämgruppen im zellfreien Extrakt (Ex.), in der löslichen Proteinfraction (LF) und in der Membranfraction (MF, 5x konzentriert) der schwarzen mikrobiellen Matte BS 328-153 im Polyacrylamid-Gel. Rechts: Färbung aller Proteine in den gleichen Fractionen mit Coomassie Brilliant Blue.

Der hohe Gehalt an Cytochromen lässt vermuten, dass diese möglicherweise Bedeutung für die AOM besitzen, als Komponenten der Elektronenübertragung innerhalb der Membranen oder als Elektronenüberträger zwischen ANME und SRB. Interessanterweise exprimieren ANME-1 eine Reihe von Genen für Multihäm-Cytochrome vom *c*-Typ, die Größen von 12 bis 29 kDa besitzen (Meyerdierks et al. 2009). Es wurde angestrebt, die abundanten Cytochrome zu reinigen, um festzustellen, ob sie von ANME oder den SRB exprimiert werden. In der Membranfraction der mikrobiellen Matten BS 328-153 wurden zwei Proteinbanden von etwa 30 kDa Größe mit Hämperoxidase-Aktivität detektiert. Zumindest zu einer dieser Banden wurde eine entsprechende Bande im Coomassie-gefärbten Polyacrylamid-Gel gefunden (Abb. A-1B). Eine Reinigung dieser abundanten Proteine über Anionen-Austausch-Chromatographie erscheint Vorversuchen zufolge aussichtsreich.

## 2. Phylogenie der ATP-Sulfurylase (Sat) inklusive neuer Sequenzen

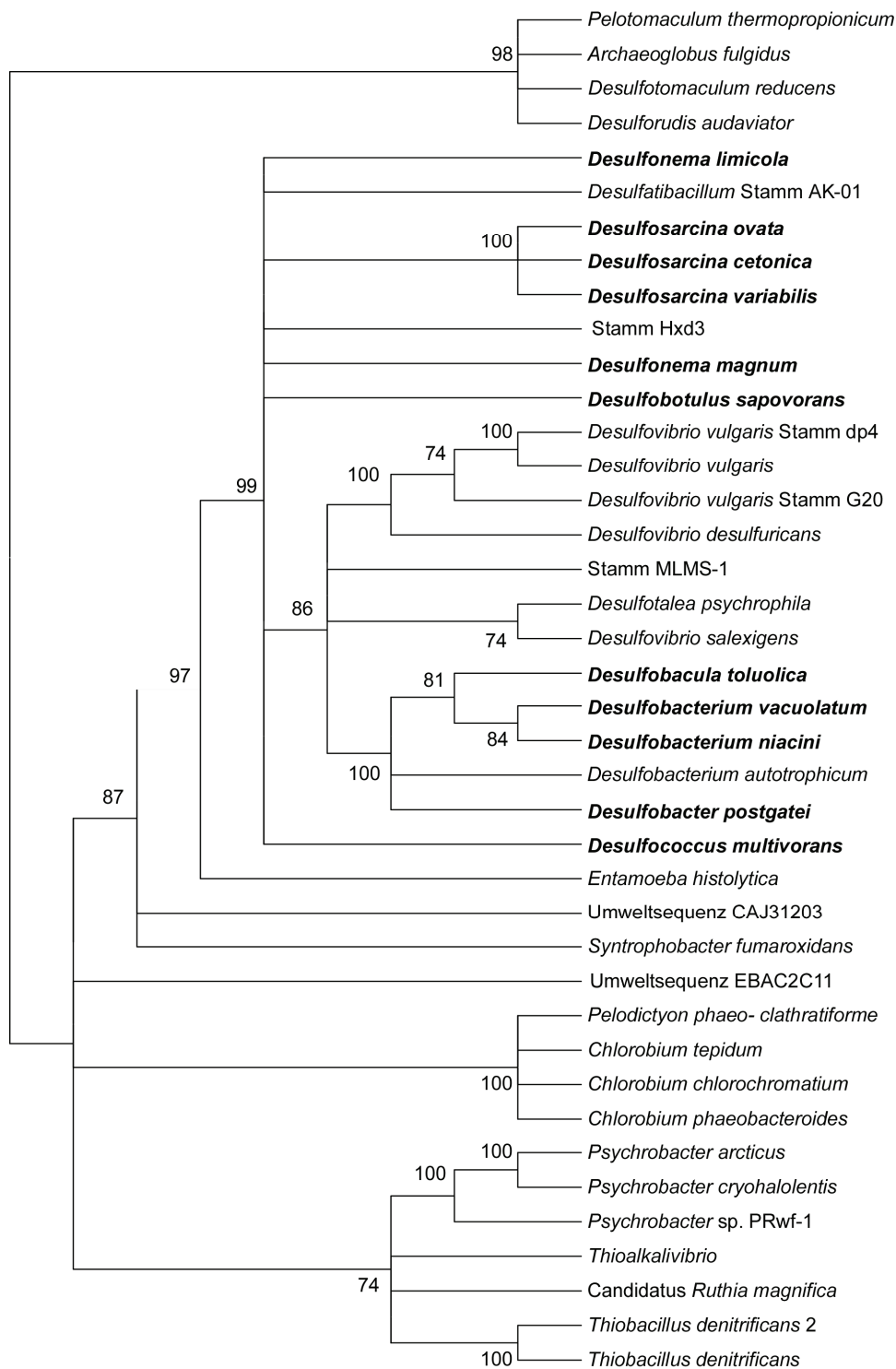
Während die *aprBA*- und *dsrAB*-Sequenzen als Grundlage phylogenetischer Studien für viele sulfatreduzierende Prokaryoten bestimmt wurden (Friedrich 2002; Meyer & Küver 2007; Wagner et al. 1998), sind Sequenzen des Gens für die dissimilatorischen ATP-Sulfurylase (*sat*)

ausschließlich aus den Genomanalysen bekannt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Primerkombination (Sat-19F und Sat-1059R) entwickelt, mit deren Hilfe die fast vollständigen *sat*-Sequenzen von *Desulfonema limicola*, *Desulfonema magnum*, *Desulfosarcina variabilis*, *Desulfosarcina cetonica*, *Desulfosarcina ovata*, *Desulfobotulus sapovorans*, *Desulfobacula toluolica*, *Desulfobacterium vacuolatum*, *Desulfobacterium niacini*, *Desulfobacter postgatei* und *Desulfococcus multivorans* ermittelt wurden.

Die Topologie des phylogenetischen Baumes der *Sat* ist der des phylogenetischen Baumes der *Apr*- und der *Dsr* vergleichbar (Abb. A-2). Er weist eine Unterteilung in drei große Gruppen von *Sat*-Sequenzen auf, in Schwefeloxidierer, Deltaproteobakterien und gram-positive SRB. *Sat* von *Archaeoglobus* bildet eine Linie mit den Gram-positiven SRB, was erneut zeigt, dass *Archaeoglobus* die für die Sulfatreduktion essentiellen Gene vermutlich über lateralen Transfer erlangte. Interessanterweise besitzt *Entamoeba histolytica* auch ein *sat*-Gen, das verwandt zu der *sat* aus SRB ist (Boucher et al. 2003).

Die Position der *Sat* von *Desulfobacter* sp. und *Desulfobacterium* sp. ähnelt der im phylogenetischen Baum des 16S rRNA Gens (Meyer & Küver 2007). Die Sequenzen der *Desulfosarcina*-Arten bilden eine eigene Gruppe. Die Position der weiteren Sequenzen aus der *Desulfosarcina/Desulfococcus*-Gruppe kann nicht genau aufgeschlüsselt werden. Um eine genauere phylogenetische Analyse auch der *Sat* durchzuführen, ist es notwendig, *sat* auch aus weiteren SRB zu amplifizieren und zu sequenzieren. Dafür bieten die entwickelten eine Primer Sat-19F und Sat-1059R und die ermittelten *sat*-Sequenzen eine neue Grundlage.

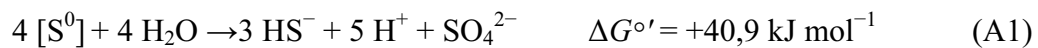




**Abbildung A-2.** Phylogenetischer Baum der ATP-Sulfurylase (Sat). Neu ermittelten Sequenzen sind fett dargestellt. Bootstrap-Werte in % angegeben. Erstellt von Jan Küver.

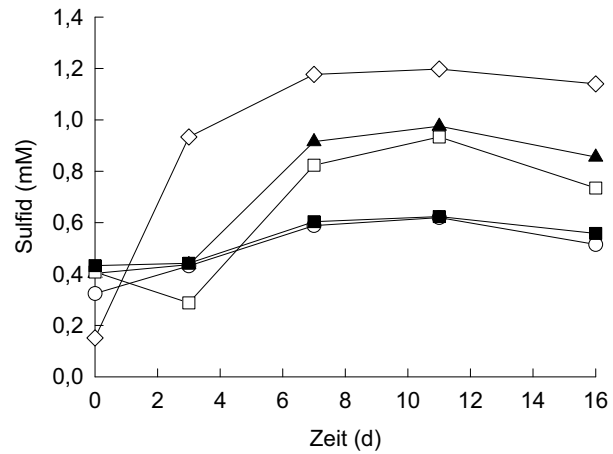
### 3. Experiment zur möglichen Komproportionierung von Sulfid und Sulfat durch *Desulfocapsa sulfexigens*

Thermodynamisch ist eine Komproportionierung von Sulfid und Sulfat zu elementarem Schwefel oder Polysulfid (Abschnitt C.2.2) möglich, insofern die Konzentration des Schwefels niedrig bleibt. Daher ist vorstellbar, dass es in marinen Sedimenten Komproportionierer gibt, die mit Schwefel reduzierenden Mikroorganismen koexistieren, obgleich diese Kokulturen mit Sulfatreduzierern in Konkurrenz um Elektronendonatoren stehen. Es sind auch nur wenige Organismen bekannt, die elementaren Schwefel  $[S^0]$  zu Sulfat und Sulfid disproportionieren (Gl. A1), darunter der Sulfatreduzierer *Desulfobulbus propionicus* (Lovley & Phillips 1994).



*Desulfocapsa sulfexigens*, eine marine Art, die keine Sulfatreduktion katalysiert, wurde zunächst für einen obligaten Schwefeldisproportionierer gehalten, kann aber auch Schwefelreduktion mit Wasserstoff als Elektronendonator betreiben (Frederiksen & Finster 2004). In der nicht-kontinuierlichen (batch-) Kultivierung benötigt *D. sulfexigens* Fe(III). So wird das Produkt der Disproportionierung, Sulfid, als FeS präzipitiert, womit die Reaktion in Richtung der Produkte verschoben wird. Ohne Fe(III) bildet *D. sulfexigens* auch geringe Mengen an Sulfid (Abb. A-3), die Disproportionierung stoppt aber nach einigen Tagen, und es findet kein Wachstum statt (Finster et al. 1998). Der enzymatische Weg, mit dem *D. sulfexigens* elementaren Schwefel disproportioniert, ist zum Teil noch unbekannt. Die Aktivität aller an der Sulfatreduktion beteiligten Proteine sowie einer Sulfit-Oxidoreduktase konnte im Zellextrakt nachgewiesen werden, jedoch keine Polysulfid/Schwefel-Reduktase (Frederiksen & Finster 2003). Daher ist unbekannt, wie Schwefel zu Sulfit oxidiert bzw. zu Sulfid reduziert wird.

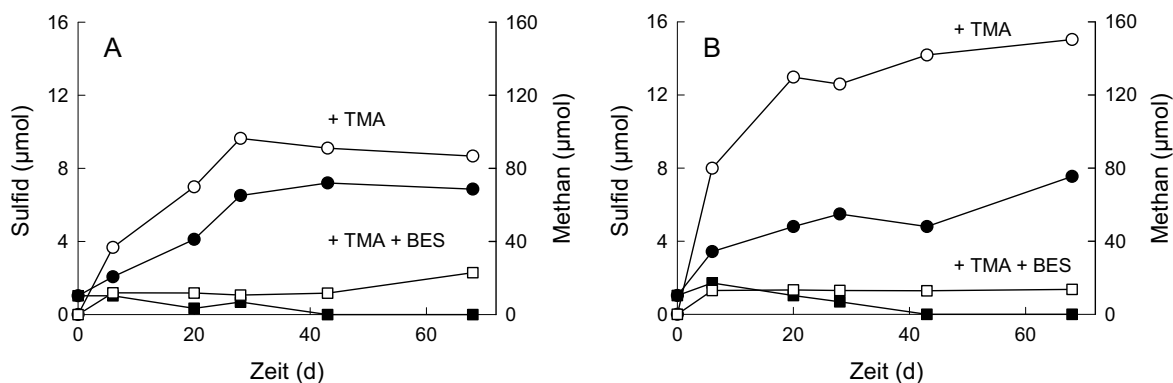
Unter thermodynamischen Gesichtspunkten wäre es möglich, dass *D. sulfexigens* in Kokultur mit einem heterotrophen Schwefelreduzierer Sulfat und Sulfid zu Polysulfid komproportioniert. Um dies zu prüfen, wurde einer Kultur von *D. sulfexigens* eine aktive Zellsuspension des Schwefelreduzierers *D. acetoxidans* zugesetzt (Abschnitt B.1.5). Bei Zugabe von Acetat, eines Elektronendonators für *D. acetoxidans*, produzierte die Kokultur kein Sulfid (Abb. A-3). Dies ist ein Hinweis darauf, dass *D. sulfexigens* kein Polysulfid bzw. anderen  $[S^0]$  produzierte, den *D. acetoxidans* als Elektronenakzeptor hätten nutzen können; es fand also vermutlich keine Komproportionierung statt.



**Abbildung A-3.** Kokultur-Experiment zur Komproportionierung durch *Desulfocapsa sulfexigens* ( $10^6$  Zellen  $\text{ml}^{-1}$ ). Sulfidproduktion mit  $[S^0]$  ( $\circ$ ); Sulfidproduktion aus Sulfat ohne  $[S^0]$  ( $\diamond$ ), mit 5 mM Acetat ( $\square$ ), mit *Desulfuromonas acetoxidans* ( $7 \times 10^7$  Zellen  $\text{ml}^{-1}$ ) ( $\blacktriangle$ ) sowie mit *D. acetoxidans* und 5 mM Acetat ( $\blacksquare$ ).

#### 4. Ko-Anreicherung von SRB mit Trimethylamin-abbauenden Methanogenen

Trimethylamin (TMA) und Methanol sind Substrate von methanogenen Archaeen (Abschnitt A.1.2), während nur wenige SRB Methanol verwerten können und kein Sulfatreduzierer bekannt ist, der TMA nutzt. Dennoch bewirkte die Zugabe von TMA oder Methanol zu verschiedenen reduzierten marinen Sedimenten eine leichte Sulfidproduktion (Daten nicht gezeigt). Es ist unbekannt, auf welchem Weg die SRB Reduktionsäquivalente von den Archaeen erhielten, und welche SRB für die Sulfatreduktion verantwortlich waren.



**Abbildung A-4.** Abhängigkeit der Sulfidproduktion aus Sulfat (●) von der Methanogenese (○) in (A) mikrobiellen Matten aus dem Schwarzen Meer (BS P784) mit 7,5 mM Trimethylamin (TMA) und (B) Sediment vom Isis MV mit 10 mM TMA. Keine Methanbildung (□) und Sulfidbildung (■) erfolgte mit TMA bei Zugabe von 10 mM Bromoethansulfonat (BES). 10 ml Kulturen mit 10 ml Gasraum, inkubiert bei 12°C.

Auch in der anaeroben Oxidation von Methan (AOM) erhalten die assoziierten SRB vermutlich Reduktionsäquivalente von Archaeen, in diesem Fall den ANME. Da die Mechanismen des extrazellulären Elektronentransfers ebenfalls unbekannt und möglicherweise ähnlich sind, wurden auch Inkubationen von mikrobiellen Matten aus dem Schwarzen Meer und Sediment von Isis MV mit TMA angesetzt. Es wurde eine Methanbildung beobachtet, die vermutlich auf eine Anreicherung von *Methanococcoides* sp. zurückzuführen ist. Die neun Isolate methanogener Archaeen aus diesen Anreicherungen sind zwei Arten dieser Gattung zuzuordnen (Tabelle A-1). Ebenso wie in den anoxischen marinen Sedimenten wurde eine Sulfidproduktion festgestellt, die etwa 3% der Elektronen aus dem Substrat entsprach (Abb. A-4). Durch die Zugabe von Bromoethansulfonat, einem spezifischem Inhibitor der Methanogenese, wurde in beiden Kulturen auch die Sulfidbildung gehemmt, was darauf hindeutet, dass die Aktivität von Sulfatreduzierern in diesen Inkubationen an die Aktivität der methanogenen Archaeen gekoppelt war. Vor diesem

Hintergrund bestand die Möglichkeit, die ANME-assozierten SRB oder andere unbekannte SRB als Begleitorganismen der Methanogene anzureichern. Entsprechend wurden die Kulturen mehrfach transferiert und in die semi-kontinuierliche Kultur überführt. Unter Substratlimitierung fand jedoch keine weitere Anreicherung der SRB statt, was man daran erkennen kann, dass prozentual nicht mehr Elektronen in die Sulfidbildung eingingen. Im Gegensatz dazu wurde in künstlichen Kokulturen, in denen die SRB zu Beginn einen höheren Anteil an den Gesamtzellen besaßen, ein syntropher Transfer von über 50% der Elektronen aus Acetat oder Methanol von Methanogenen zu SRB festgestellt (Phelps et al. 1985). In Klonbibliotheken des 16S rRNA Gens aus den semi-kontinuierlichen Kulturen wurden unter anderem Sequenzen von *Desulfovibrio* sp. gefunden, und zwei Isolate aus Verdünnungen der auf der TMA gewachsenen Kulturen stammen aus der Gattung *Desulfovibrio* (Tabelle A-1). Daher könnte ein Wasserstofftransfer von den TMA bzw. Methanol abbauenden Methanogenen zu den SRB stattgefunden haben. Experimente mit Sedimenten zeigen die Bedeutung der Sulfatreduktion als Wasserstoffsенke für die methylo trope Methanogenese (Finke et al. 2007). Die Experimente boten also keinen Hinweis auf einen Wasserstoff-unabhängigen Transfer von Reduktionsäquivalenten von den Archaeen zu den SRB.

**Tabelle A-1.** Isolate aus Agar-Verdünnungsreihen der methanogenen Anreicherungen mit Trimethylamin

Isolate	Gattung*	Nächstverwandte Art* (% Sequenzidentität) (Zugangsnr.)	Substrat für die Isolierung
Isis-TMA-1,-2,-3,-4	<i>Methanococcoides</i> sp.	<i>M.</i> Stamm NaT1 (99) (Y16946)	TMA (10 mM)
Isis-TMA-Lac-1	<i>Desulfovibrio</i> sp.	<i>D.</i> Spezies Pr.1.2 (97) (AF228128)	Lactat (10 mM)
BS-TMA-1,-2,-5,-6	<i>Methanococcoides</i> sp.	<i>M. burtonii</i> DSM 6242 (99)	TMA (10 mM)
BS-TMA-3	<i>Methanococcoides</i> sp.	<i>M.</i> Stamm NaT1 (98) (Y16946)	TMA (10 mM)
BS-TMA-Lac-1	<i>Desulfovibrio</i> sp.	<i>D.</i> Spezies. HS2 (99) (AY274444)	Lactat (10 mM)

\* nächstverwandte Reinkultur bei BLAST, z. T. nur auf Basis von Partialsequenzen des 16S rRNA Gens

**Literatur**

- Basford, R. E., Tisdale, H. D., Glenn, J. L. & Green, D. E. (1957) Studies on the terminal electron transport system. 7. Further studies on the succinic dehydrogenase complex. *Biochimica et Biophysica Acta* **24**, 107–115.
- Boucher, Y., Douady, C. J., Papke, R. T., Walsh, D. A., Boudreau, M. E. R., Nesbo, C. L., Case, R. J. & Doolittle, W. F. (2003) Lateral gene transfer and the origins of prokaryotic groups. *Annual Review of Genetics* **37**, 283–328.
- Finke, N., Hoehler, T. M. & Jorgensen, B. B. (2007) Hydrogen 'leakage' during methanogenesis from methanol and methylamine: implications for anaerobic carbon degradation pathways in aquatic sediments. *Environmental Microbiology* **9**, 1060–1071.
- Finster, K., Liesack, W. & Thamdrup, B. (1998) Elemental sulfur and thiosulfate disproportionation by *Desulfocapsa sulfoexigens* sp. nov., a new anaerobic bacterium isolated from marine surface sediment. *Applied and Environmental Microbiology* **64**, 119–125.
- Frederiksen, T. M. & Finster, K. (2003) Sulfite-oxido-reductase is involved in the oxidation of sulfite in *Desulfocapsa sulfoexigens* during disproportionation of thiosulfate and elemental sulfur. *Biodegradation* **14**, 189–198.
- Frederiksen, T. M. & Finster, K. (2004) The transformation of inorganic sulfur compounds and the assimilation of organic and inorganic carbon by the sulfur disproportionating bacterium *Desulfocapsa sulfoexigens*. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology* **85**, 141–149.
- Friedrich, M. W. (2002) Phylogenetic analysis reveals multiple lateral transfers of adenosine-5'-phosphosulfate reductase genes among sulfate-reducing microorganisms. *Journal of Bacteriology* **184**, 278–289.
- Jones, C. W. & Poole, R. K. (1985) The analysis of cytochromes. In *Methods in microbiology*, vol. 18 (ed. G. Gottschalk), pp. 285–328. London: Academic Press.
- Lovley, D. R. & Phillips, E. J. P. (1994) Novel processes for anaerobic sulfate production from elemental sulfur by sulfate-reducing bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **60**, 2394–2399.
- Matias, P. M., Pereira, I. A. C., Soares, C. M. & Carrondo, M. A. (2005) Sulphate respiration from hydrogen in *Desulfovibrio* bacteria: a structural biology overview. *Progress in Biophysics & Molecular Biology* **89**, 292–329.
- Methe, B. A., Nelson, K. E., Eisen, J. A., Paulsen, I. T., Nelson, W., Heidelberg, J. F., Wu, D., Wu, M., Ward, N., Beanan, M. J., Dodson, R. J., Madupu, R., Brinkac, L. M., Daugherty, S. C., DeBoy, R. T., Durkin, A. S., Gwinn, M., Kolonay, J. F., Sullivan, S. A., Haft, D. H., Selengut, J., Davidsen, T. M., Zafar, N., White, O., Tran, B., Romero, C., Forberger, H. A., Weidman, J., Khouri, H., Feldblyum, T. V., Utterback, T. R., Van Aken, S. E., Lovley, D. R. & Fraser, C. M. (2003) Genome of *Geobacter sulfurreducens*: Metal reduction in subsurface environments, vol. 302, pp. 1967–1969.

- Meyer, B. & Küver, J. (2007) Phylogeny of the alpha and beta subunits of the dissimilatory adenosine-5'-phosphosulfate (APS) reductase from sulfate-reducing prokaryotes - origin and evolution of the dissimilatory sulfate-reduction pathway. *Microbiology* **153**, 2026–2044.
- Meyerdierks, A., Kube, M., Kostadinov, I., Teeling, H., Glöckner, F. O., Reinhardt, R. & Amann, R. (2009) Genome and mRNA expression analysis indicates the implication of multiple multiheme *c*-type cytochromes in the metabolism of anaerobic methanotrophic archaea of the ANME-1 group (*in press*). *Environmental Microbiology*
- Phelps, T. J., Conrad, R. & Zeikus, J. G. (1985) Sulfate-dependent interspecies H<sub>2</sub> Transfer between *Methanosarcina barkeri* and *Desulfovibrio vulgaris* during coculture metabolism of acetate or methanol. *Applied and Environmental Microbiology* **50**, 589–594.
- Pimenov, N. V., Rusanov, I. I., Poglazova, M. N., Mityushina, L. L., Sorokin, D. Y., Khmelenina, V. N. & Trotsenko, Y. A. (1997) Bacterial mats on coral-like structures at methane seeps in the Black Sea. *Microbiology* **66**, 354–360.
- Seeliger, S., Cord-Ruwisch, R. & Schink, B. (1998) A periplasmic and extracellular *c*-type cytochrome of *Geobacter sulfurreducens* acts as a ferric iron reductase and as an electron carrier to other acceptors or to partner bacteria. *Journal of Bacteriology* **180**, 3686–3691.
- Wagner, M., Roger, A. J., Flax, J. L., Brusseau, G. A. & Stahl, D. A. (1998) Phylogeny of dissimilatory sulfite reductases supports an early origin of sulfate respiration. *Journal of Bacteriology* **180**, 2975–2982.





## **Danksagung**

Die allerletzte Seite sei all jenen gewidmet, die mich während der letzten vier Jahre auf vielfältige Art und Weise unterstützt haben, und ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Ich möchte mich zu allererst bei meinem Doktorvater Herrn Widdel, bedanken, dass ich unter seiner Betreuung an einem der faszinierendsten Themen der Mikrobiologie arbeiten durfte. Herr Widdel entwickelte zahlreiche spannende Ideen für diese Arbeit und ließ mir gleichzeitig die Freiheit zur Umsetzung meiner eigenen. Viele anregende Diskussionen mit ihm schärften meinen Blick für das Wesentliche und das Neue.

Herrn Schink danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens. In seinen Vorlesungen an der Universität Konstanz hat er mein Interesse für die Mikrobiologie geweckt, und in seiner Arbeitsgruppe durfte ich meine ersten Gehversuche in der Mikrobiologie machen.

Mein Dank gilt auch allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe von Herrn Thauer am Max-Planck-Institut in Marburg für die angenehme und hilfreiche Atmosphäre während meiner Aufenthalte dort. Besonders gedankt seien Herr Thauer für interessante Diskussionen und Denkanstöße, Jörg Kahnt für die Übernahme vieler Analysen und besonders Seigo Shima für seine unermüdliche und kompetente Betreuung.

Korneel Rabaey und Willy Verstraete führten mich in die spannende Welt der mikrobiellen Brennstoffzellen während meiner Zeit im LABMET in Gent ein. Jan Küver von der Materialprüfungsanstalt in Bremen danke ich für phylogenetische Analysen und kurzweilige Gespräche. Martin Krüger von der Bundesanstalt für Geowissenschaften und Rohstoffe in Hannover weckte mein Interesse für die Biochemie der AOM.

Zudem geht ein großer Dank an meine lieben und hilfsbereiten Kollegen am MPI Bremen, und besonders in der Abteilung Mikrobiologie. Die Zusammenarbeit mit Jana Milučká, Thomas Holler und Christian Deusner in unserer AOM-„Mini“-Gruppe war sehr inspirierend und fand immer in einer netten Atmosphäre statt. Volker Meyer entwickelte

die Mess- und Regelungstechnik für die Elektrochemie-Experimente, und machte zudem mein Fahrrad durch diverse Umbau- und Schweißarbeiten immer wieder fit. Außerdem durfte ich in so mancher Kaffeepause mit Volker, Paul, Harald und Ingrid zwischendurch mal meine Seele baumeln lassen. Simon Kühner, Olav Grundmann und Kathleen Trautwein verdanke ich eine sehr unterhaltsame Zeit im Büro. Sie waren zudem nimmermüde, sich auf meine zahlreichen Fragen einzulassen. Weiterer Dank geht an Ramona Appel, Antje Boetius, Alexander Galushko, Jens Harder, Sixing Huang, Anke Meyerdierks, Florin Musat, André Scheffel, Tanja Shabarova und Bernd Stickfort. Für das gewissenhafte Korrekturlesen danke ich noch einmal Anke, Simon, Olav sowie Birte Meyer. Danke auch an Claus, Nadine, Insa und Lars für spannende Werder-Abende und die schöne Zeit.

Außerdem ich mich bei meinen Eltern bedanken, denen ich meine Begeisterung für die Natur verdanke, und die mich immer in meinen Vorhaben unterstützt und begleitet haben. Einen besonderen Dank möchte ich Marijke widmen, für ihre Geduld mit mir an langen Laborabenden, für die Aufmunterungen während der Schreibphasen, sowie für die schönen gemeinsamen Erlebnisse während der ganzen Zeit.