

Funktionelle Untersuchungen der mikrobiellen Gemeinschaft in Sedimenten von marinen Schlammvulkanen

DIPLOMARBEIT

Dorothee Anne Makarow

Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät

Sektion Biologie

Institut für allgemeine Mikrobiologie

und

**Leibniz Institut für Meereswissenschaften
(IFM GEOMAR)**

Kiel 2010

Referent: Prof. Dr. R. A. Schmitz-Streit
Tag der Abgabe der Diplomarbeit: 01.03.2010
Letzter Tag der mündlichen Prüfung: 15.02.2009

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGEN

ZUSAMMENFASSUNG

1. EINLEITUNG

1.1	Submarine Schlammvulkane	001
1.2	Die Anaerobe Oxidation von Methan	003
1.3	AOM-katalysierende Mikroorganismen	005
1.4	Physiologie der AOM-Konsortien	006
1.5	Der Einfluss von Umweltparametern auf die Prozessraten	007
1.6	Das Leben in Zellaggregaten	007
1.7	Mikrobielle Kooperation über chemische Kommunikation	009
1.8	<i>Quorum quenching</i>	011
1.9	Metagenomik	012
1.10	Ziele dieser Arbeit	012

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1	Untersuchungsgebiet - North Alex Schlammvulkan	015
2.2	Organismen und Plasmide	019
2.3	Oligonukleotide und Kits	020
2.4	Chemikalien und Biochemikalien	022
2.5	Nährmedien und Medienzusätze	023
2.6	Puffer und Lösungen	026
2.7	Anzucht und Zellernte	028
2.8	Extraktion von AHL-Molekülen	029
2.9	Herstellung von Zellextrakt und Überstand für QQ	030
2.10	DNA-Isolierung	030
2.11	Gelelektrophorese	031
2.12	Standardtechniken zum Arbeiten mit Nukleinsäuren	033
2.13	Polymerase-Ketten-Reaktion	034
2.14	Ligation	035
2.15	Transformation von DNA in <i>E. coli</i>	035
2.16	DNA-Sequenzierung und Analyse	036
2.17	Screening auf QS-/QQ-Aktivität	037
2.18	Proteinaufreinigung mittels Affinitätschromatographie	038
2.19	CARD FISH	039
2.20	Gaschromatographie	042
2.21	Photometrie	043

2.22 Radiotracer-Inkubationen	043
-------------------------------	-----

3. ERGEBNISSE

3.1	Temperaturoptimum der methan-abhängigen Sulfatreduktion	046
3.2	AOM:SR Stöchiometrie	047
3.3	Diversitätsanalyse der bakteriellen 16S rDNA-Sequenzen	049
3.4	Diversitätsanalyse der archaeellen 16S rDNA-Sequenzen	051
3.5	Strukturanalyse der mikrobiellen Lebensgemeinschaften	052
3.6	Screeningtests zum Nachweis AHL-produzierender Bakterien	056
3.7	Durchmusterung der Metagenombank auf QQ-Aktivität	058
3.8	Subklonierung	058
3.9	Identifikation Protein-kodierender offener Leserahmen auf pRS628 und pRS629	060
3.10	Sequenzanalyse des Klons <i>E. coli</i> DH5a/pRS629	061
3.11	Sequenzanalyse des Klons <i>E. coli</i> DH5a/pRS628	062
3.12	Überexpression und Affinitätschromatographie von QQ 1	064
3.13	Überprüfung des gereinigten Proteins QQ 1 auf QQ-Aktivität	065
3.14	Effekt von QQ 1 auf das Schwärmverhalten bei <i>E. coli</i> BL21 (DE3)	066

4. DISKUSSION

4.1	Anaerobe Oxidation von Methan	067
4.2	Diversität mikrobieller Lebensgemeinschaften am NAMV	069
4.3	Mikrobielle Konsortien am NAMV	073
4.4	<i>Quorum sensing</i> mikrobieller Lebensgemeinschaften am NAMV	073
4.5	<i>Quorum quenching</i> mikrobieller Lebensgemeinschaften am NAMV	075
4.6	Mögliche QQ-Moleküle von <i>E. coli</i> DH5a/pRS628	075
4.7	Identifikation des QQ-ORFs von <i>E. coli</i> DH5a/pRS629	077
4.8	Ausblick	078

5. LITERATURVERZEICHNIS	080
--------------------------------	-----

6. ANHANG	093
------------------	-----

ABKÜRZUNGEN

ad	bis
AHL	N-Acyl-L-Homoserin-Lacton
AI	<i>Autoinducer</i>
Amp	Ampicillin
ANME	anaerobe Methanotrophe
AOM	Anaerobe Oxidation von Methan
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
bp	Basenpaare
CARD-FISH	catalyzed reporter deposition fluorescence <i>in situ</i> hybridization
Cm	Chloramphenicol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat
DSS	<i>Desulfosarcina</i>
<i>E.</i>	<i>Escherichia</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EK	Einzelklone
EPS	extrazellulären polymeren Substanzen
<i>et al.</i>	und andere
GC	Gaschromatograph
HRP	Meerrettichperoxidase (engl.: Horseradish)
IPTG	Isopropyl- β -thiogalaktopyranosid
K-Ac	Kalium-Acetat
kb	Kilobasen
<i>lacZ</i>	Gen für das α -Peptid der β -Galaktosidase
NAMV	North Alex Schlammvulkan (engl.: mud volcano)
mod.	modifiziert
MTP	Mikrotiterplatte
MUC	Multicorer
MV	Schlammvulkan (engl.: mud volcano)
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NIOZ	Royal Netherlands Institute for Sea Research
OD	optische Dichte
ORF	offener Leserahmen (engl.: open reading frame)
PCR	Polymerasekettenreaktion
QQ	Quorum Quenching
QS	Quorum Sensing
rDNA	ribosomale Desoxyribonukleinsäure
RG	Reaktionsgefäß

RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehung pro Minute (engl.: rounds per minute)
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodium-Dodecyl-Sulfat
SMTZ	Sulfat-Methantransitionszone
SN	Überstand (engl.: supernatant)
SRB	Sulfatreduzierer (engl.: sulfate-reducing bacteria)
SRR	Sulfatreduzierungsrate
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
ÜN-Kultur	Übernachtkultur
UV	Ultraviolett
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -DGalactopyranosid
ZE	Zellextrakt

ZUSAMMENFASSUNG

In marinen Sedimenten stellt die anaerobe Methanoxidation (AOM) eine wichtige Senke des Treibhausgases Methan dar. In submarinen Schlammvulkanen kann der kontinuierliche Austritt von Gasblasen und methanreichen Fluiden bewirken, dass ein nicht unwesentlicher Anteil des Methans den mikrobiellen Filter aus Methanotrophen passieren kann. Um den Kontrollmechanismus der Methan-emission in so einem Ökosystem besser zu verstehen, wurden in dieser Arbeit mikrobielle AOM- und Sulfatreduktionsraten (SRR) des North Alex Schlammvulkans bestimmt und die Temperaturabhängigkeit des Prozesses untersucht. Diese wurden durch eine Analyse der Diversität und Struktur mikrobieller Lebensgemeinschaften in Sedimenten des Kraterzentrums ergänzt, die an geologische und biogeochemische Prozesse der Gas- und Flüssigkeitsausstritte gekoppelt sind. Ein weiterer Aspekt der Arbeit beschäftigt sich mit der bakteriellen Zell-Zell-Kommunikation (*Quorum Sensing*) über Autoinducer, Grundlage für Entstehung von Biofilmen und Konsortien. Für eine Charakterisierung des Habitats sollte daher eine Metagenombank der mikrobiellen Gemeinschaft des Schlammvulkans nach *Quorum Sensing*-Molekülen und *Quorum Sensing* inhibierenden Proteinen durchmustert werden.

- An Sedimentproben von North Alex konnte die direkte Abhängigkeit der Sulfat-Reduktion von Methan als Elektronendonator gezeigt werden, da nur in Inkubationen mit Methan aus der Reduktion von Sulfat Sulfid gebildet wurde, nicht aber in Kontrollexperimenten ohne Methan. Die Sedimentproben zeigten ein mesophiles Temperaturprofil mit den höchsten methanabhängigen Sulfat-Reduktionsraten zwischen 16 und 23 °C. Bei höheren und niedrigeren Temperaturen sank die Aktivität. Das Temperaturoptimum der AOM wurde bei 23 °C erreicht, mit einem Aktivitätsmaximum von $\sim 200 \text{ nmol cm}^{-3} \text{ Tag}^{-1}$.
- Aus drei verschiedenen Sedimentschichten (0-1 cm, 4-5 cm und 29-31cm) des Kraterzentrums wurde Gesamt-DNA isoliert und ein vertikales Profil der Biodiversität erstellt. In der bakteriellen 16S rDNA-Analyse dominierten die δ -(40 %), γ -(28 %) und ϵ -*Proteobacteria* (11 %). Innerhalb der δ -*Proteobacteria* wurden von den typischen Seep-Sulfatreduzierern nur *Desulfobulbus* (2 %) gefunden. Sequenzen mit hohen Frequenzen konnten den Gattungen *Desulfobacterium* (14 %), *Desulfobacula* (13 %) und *Desulfatibacillum* (7 %) zugeordnet werden. Ein Großteil der Sequenzen in der archaeellen 16S rDNA-Analyse erzielten die größten Ähnlichkei-

keiten zu Vertretern der GOM Arc I (44 %) und der Marine Group I (41 %). Lediglich 7 % der Sequenzen konnten bekannten Methotrophen (ANME-2a) zugeordnet werden.

- Die quantitative Zusammensetzung und die vertikale Verteilung AOM-assoziiierter Gruppen wurden mittels Catalyzed Reporter Deposition Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung untersucht. In Sedimenten am North Alex wurden Gesamtzellzahlen von 10^9 - 10^{10} Zellen \times ml^{-1} ermittelt. Entgegen der 16S rDNA-Analyse zeigte die *Desulfosarcina/Desulfococcus*-Gruppe *in situ* große Abundanzen mit einer maximalen Detektionsrate von 34 % DAPI-gefärbter Zellen. In der mittleren Sedimentschicht stellten Aggregate (4-20 μM), aus einem inneren Kern unbekannter Archaea umgeben von unbekanntem Bacteria, den Großteil der Biomasse. Obwohl bekannte AOM-assoziierte Mikroorganismen wie ANME-2/-2a und *Desulfosarcina/Desulfococcus*- und *Desulfobulbus*-Verwandte detektiert wurden, bildeten sie keine Aggregate. Im tiefsten Sedimenthorizont wurden vereinzelt bakterielle und archaeelle Aggregate (10-15 μM) gefunden. Ein besonderes Merkmal dieser Aggregate war die fehlende Vergesellschaftung von Bacteria und Archaea. Auch kleine Aggregate (< 5 μM) von ANME-2 mit unbekanntem bakteriellem Partner konnten detektiert werden.
- Aus isolierter Gesamt-DNA der mittleren Sedimentschicht wurde eine 8.064 Einzelklone umfassende Metagenombank (abgelegt in 96 Mikrotiterplatten) konstruiert. Aus Kulturüberständen dieser metagenomischen Klone sowie aus Kulturüberstand der *in vitro* Inkubationen der Sedimente wurden potentielle AHL extrahiert und anschließend auf *Quorum sensing*-Aktivität getestet. Die Detektion von AHL-Signalmolekülen erfolgte mit Hilfe des AHL-Sensorbakteriums *C. violaceum* CV026 und dem Reporterstamm *E. coli* DH5 α /pRS354. Mit dem Reporterstamm *E. coli* DH5 α /pRS354 konnte in der Metagenombank ein AHL-Signal im 96er Poolmaßstab detektiert werden. Dieses Signal konnte jedoch in weiteren Analysen nicht verifiziert werden.
- Die Klone der Metagenombank „North Alex MV“ wurden unter Verwendung der beiden Reporterstämme *E. coli* DH5 α /pRS354 und *E. coli* DH5 α /pRS356 auf QQ-Aktivität hin untersucht. Die Analyse zeigte, dass insgesamt 22 96er-Pools im Kulturüberstand, sowie 7 96er-Pools im Zellextrakt mit AHL interferierten. Weiterhin zeigten 8 96er-Pools im Kulturüberstand und 2 96er-Pools im Zellextrakt

AI-2-Interferenz. Aus einer Auswahl von je 4 96er-Pools, die simultan QQ-Wirkung gegenüber den beiden Signalmolekülen AHL und AI-2 zeigten, wurden die entsprechenden QQ-vermittelnden Einzelklone identifiziert. Insgesamt wurden 34 Einzelklone mit QQ-Aktivität gegenüber AHL im Kulturüberstand und 20 aktive Einzelklone im Zellextrakt identifiziert. AI-2-Interferenz zeigten 31 Einzelklone im Kulturüberstand und 3 Einzelklone im Zellextrakt. Zwei Klone aus der Metagenombank „North Alex MV“ (37/F10, 79/E4) die simultan AHL- und AI-2-Interferenz zeigten, wurden für weitere Untersuchungen und zur Identifizierung potentieller QQ-vermittelnder ORFs ausgewählt.

- Der Fosmidklon 79/E4 der Metagenombank „North Alex MV“ zeigte simultan QQ-Aktivität gegenüber AHL und AI-2. Auf einem 2,8 kb subklonierten *Bam*HI-Fragment wurde unter Verwendung der Reporterstämme DH5a/pRS354 und DH5a/pRS356 Interferenz gegenüber beiden Signalmolekülen detektiert. Mittels Sequenzanalyse wurden auf dem subklonierten Fragment (pRS629) zwei putative QQ-ORFs identifiziert. Aus Zeitgründen konnten keine weiteren Analysen hinsichtlich der beobachteten QQ-Aktivität unternommen werden.
- Das Originalfosmid 37/F10 der Metagenombank „North Alex MV“ vermittelte ebenfalls Interferenz simultan mit AHL und AI-2. Auf dem 20 kb Fosmidinsert wurde nach Subklonierung mit *Eco*RI ein 3 kb Fragment identifiziert, welches im Test mit den Reporterstämmen DH5a/pRS354 und DH5a/pRS356 QQ-Aktivität gegenüber beiden Signalmolekülen vermittelte. Die Sequenzanalyse des subklonierten ORFs (pRS628) ergab Sequenzhomologien zu dem zyklischen di-GMP Bindeprotein (*bcsB*) aus *E. coli* str. K12 substr. MG1655. Der putative QQ-ORF wurde nach Klonierung in pMALTM-c2X überexprimiert und das entsprechende MBP-Fusionsprotein mittels Affinitätschromatographie partiell aufgereinigt. Das partiell aufgereinigte Protein MBP-QQ 1 zeigte bis zu einer Zugabe von ca. 2 µg eine deutliche Interferenz gegenüber AHL und AI-2 im Test mit den oben genannten Reporterstämmen. *In vivo* konnte gezeigt werden, dass die Expression des QQ1-ORFs in *E. coli* BL21 (DE3) dass AI-2 gesteuerte Schwärmen um ~ 80 % verminderte, ohne dabei das Wachstum negativ zu beeinflussen.

1. EINLEITUNG

1.1 Submarine Schlammvulkane

Schlammvulkane sind geologische Strukturen, die weltweit sowohl am Meeresboden als auch an Land zu finden sind (z.B. Kopf, 2002). Am Meeresboden treten Schlammvulkane an aktiven und passiven Kontinentalrändern auf, an denen sich mächtige Sedimentablagerungen gebildet haben. Durch die Entstehung von Erdöl und Erdgas, die Entwässerung von Tonmineralen und hohe Sedimentationsraten kann hier in einigen Kilometern Tiefe ein Überdruck im Porenraum entstehen, der sich oft entlang von Schwäche- oder Störungszonen entlädt und dabei ein Gemisch aus Schlamm, Wasser und Gas aufsteigen lässt. Durch kontinuierliche oder wiederholte Schlammextrusionen können sich dann am Meeresboden vulkanähnliche Strukturen bilden. Grundsätzlich werden dabei zwei Entstehungsformen unterschieden (Kopf, 2002; Abb. 1): Wenn wasser- und gasreiches Sediment aufgrund seiner geringen Dichte im Vergleich zum darüberliegenden Sediment pilzartig aufsteigt, bildet sich zunächst ein Schlammdiapir. Schlammvulkane können dann sekundär durch einen weiteren Aufstieg vom Diapir bis zum Meeresboden entstehen. Diatrems bezeichnen dagegen direkte Durchbrechungen von Schlammextrusionen aus der Mutterschicht unmittelbar bis zum Meeresboden. Häufig wird die Entstehung von Schlammvulkanen durch tektonische Kompression begünstigt (Kopf, 2002).

Neben höheren Kohlenwasserstoffen bildet Methan in der Regel den größten Teil der an Schlammvulkanen austretenden Gase. Der Ursprung des Methans kann anhand der spezifischen isotopischen Kohlenstoffsignatur bestimmt werden: Es entsteht vorwiegend durch mikrobielle Methanogenese, aber auch durch thermogene Umbildung von organischem Material (Wellsbury *et al.*, 2000). Biogenes und thermogenes Methan migriert als freies Gas oder in gelöster Form mit Fluiden entlang von Störungszonen oder grobkörnigen Sedimenthorizonten in die oberflächennahen Sedimente (z.B. Tréhu *et al.*, 2004). An Schlammvulkanen sind die Flussraten von Methan aus dem Sediment in die Wassersäule erheblich (z.B. Bohrmann *et al.*, 2003, Kopf, 2003; Milkov *et al.*, 2003).

Die methanreichen Fluide bilden in oberflächennahen Sedimenten die Grundlage für hoch spezialisierte Organismengemeinschaften wie großflächige Schwefelbakterienmatten, Bartwürmerkolonien und eine Vielzahl von Muscheln, die in diesem Habitat ein eigenes Tiefsee-Ökosystem bilden (Sibuet & Olu, 1998).

Aktive submarine Schlammvulkane mit solch einem Ökosystem sind bekannt vom zentralen Mittelmeerrücken (z.B. Omoregie *et al.*, 2008), dem zentralen amerikanischen Kontinentalrand (z.B. Hensen *et al.*, 2004), dem Golf von Cadiz (z.B. Nuzzo *et al.*, 2008) und der Barentssee (z.B. Niemann *et al.*, 2006).

Die Zahl der submarinen Schlammvulkane wird weltweit auf 10^3 bis 10^5 geschätzt (Milkov 2000, Milkov *et al.* 2003). Sie stellen somit eine bisher kaum quanti-

zierbare Methanquelle der benthischen Grenzschicht und der Hydrosphäre dar.

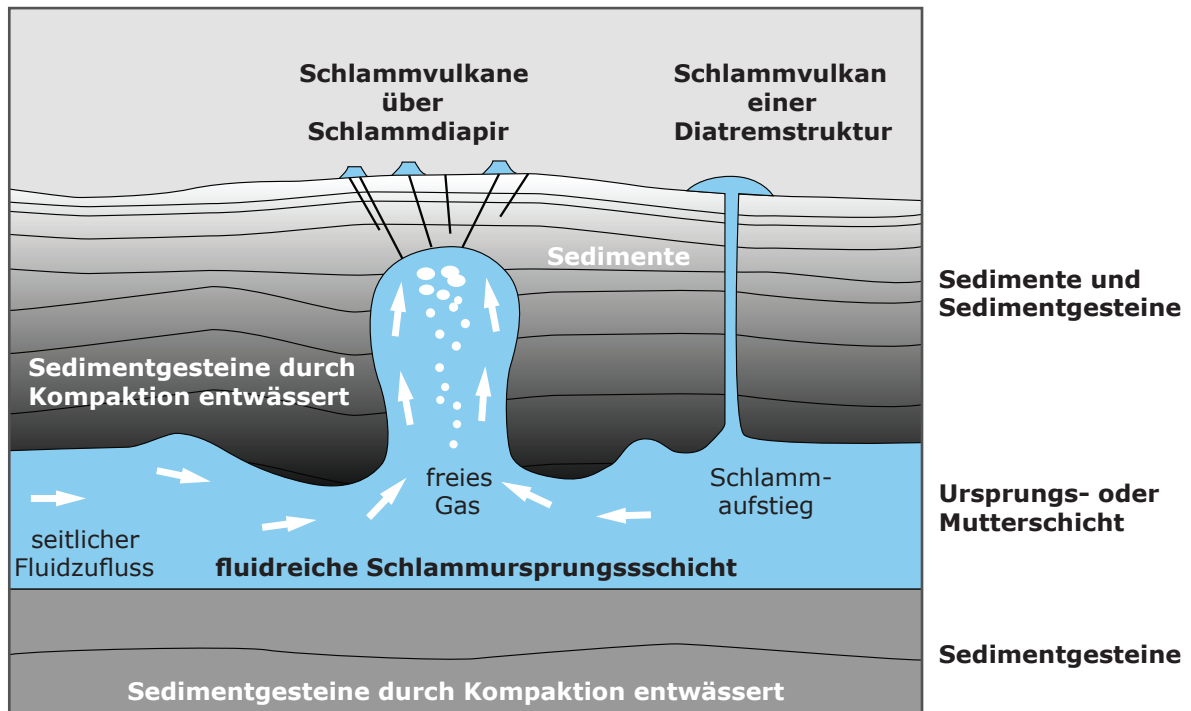


Abb. 1: Schemazeichnung von verschiedenartigem Schlammaufstieg aus einer Ursprungsschicht im tiefen Untergrund

Schlammvulkane fördern ein Gemisch aus Tonen, Wasser und Gas. Diatreme und Diapire sind unterschiedliche Strukturen von Schlammvulkanen. Wichtigste Quelle der Fluide, die den Tonbrei antreiben, sind das durch Zersetzung organischer Materie entstehende Methan, sowie Wasser, das bei der Verdichtung der Sedimente oder durch mineralisch-chemische Umwandlung in der Tiefe freigesetzt wird. (verändert nach Kopf, 2002)

Die jährliche Methanogeneserate in den Ozeanen wird auf 85-300 T g CH_4 geschätzt - das entspräche 7-25 % der globalen Methanproduktion (Matthews, 2000). Die aerobe und anaerobe mikrobielle Umsetzung von Methan stellt den Kontrollmechanismus der Methanemission in Ökosystemen mit Methansaustritten dar (cf. Judd & Hovland, 2007). Man geht davon aus, dass mehr als 90 % des in den Sedimenten gebildeten Methans von methanotrophen Mikroorganismen anaerob oxidiert wird bevor es die Atmosphäre erreichen kann (Hinrichs & Boettius 2002; Reeburgh, 2007). In submarinen Schlammvulkanen bewirkt der kontinuierliche Austritt von Gasblasen und methanreichen Fluiden, dass ein nicht unwesentlicher Anteil des Methans den mikrobiellen Filter aus Methanotrophen passieren kann. Am Håkon Mosby Schlammvulkan werden zum Beispiel mehr

als 60 % des jährlichen Methanflusses nicht mikrobiell umgesetzt (Niemann *et al.*, 2006). Der Beitrag von Schlammvulkanen zum globalen Methanhaushalt ist demnach nicht zu unterschätzen.

Für das Verständnis des globalen Kohlenstoffkreislaufs und die Rolle der Ozeane in Zeiten des Klimawandels ist die genaue Kenntnis des Prozesses der anaeroben Oxidation von Methan (AOM) und der involvierten Mikroorganismen von großer Wichtigkeit. Neben der Quantifizierung des Methanumsatzes durch mikrobielle Aktivität sind Faktoren, die die anaeroben Methanotrophen beeinflussen, von zentraler Bedeutung.

1.2 Die Anaerobe Oxidation von Methan

In natürlichen Lebensräumen stellt die aerobe Oxidation von Methan mit molekularem Sauerstoff als Elektronenakzeptor eine wichtige Reaktion zur Energieerzeugung dar.

Bereits vor über 30 Jahren wurde der anaeroben Oxidation von Methan (AOM) eine ebenso hohe Relevanz in marinen Habitaten zugesprochen. Vertikale Profile des Porenwasser mariner Sedimente zeigten die Diffusion von Methan aus tieferen Schichten bis zu einer Zone, in der Methan abgereichert wird, ohne in Kontakt mit Sauerstoff gekommen zu sein. In der gleichen Zone wiesen gegenläufige Profile der Sulfatkonzentration eine Sulfatabreicherung auf. (Barnes & Goldberg, 1976; Martens & Berner, 1977; Reeburgh, 1976). Die beiden überlappenden Profile bilden die sogenannte Sulfat-Methan-Übergangszone (englisch: sulfate-methane-transition zone = SMTZ, siehe Abb. 2). Zehnder & Brock (1979) konnten an Hand von Anreicherungskulturen methanogener Archaeen zeigen, dass gebildetes Methan nach dem Prinzip der Mikroreversibilität reoxidiert werden kann. In Konsequenz schlugen sie eine Syntrophie zwischen Methanogenen und einem als Elektronenakzeptor fungierenden Partner vor. Diese Annahme konnte durch Experimente mit radioaktiv markierten Substanzen gestützt werden, die die Abhängigkeit von Methanoxidation und Sulfatreduktion in den gleichen Sedimenthorizonten zeigten (Iversen & Jørgensen, 1985, siehe Abb. 2). Sulfat würde somit als terminaler Elektronenakzeptor des Prozesses fungieren, entsprechend folgender Gleichung:



Die Änderung der Freien Energie ist jedoch abhängig von den *in situ* Konzentrationen der Reaktanden und Produkte, welche in biologischen Systemen nie den Standardbedingungen entsprechen. Ungeachtet dieses dennoch sehr geringen Energiegewinns, den eine mit Sulfatreduktion gekoppelte anaerobe Oxidation von Methan bereitstellt, schlugen Hoehler *et al.* (1994) zur Katalyse des Pro-

zesses ein mikrobielles Konsortium, bestehend aus methanogenen Archaea und sulfatreduzierenden Bakterien (SRB) vor. In diesem Modell oxidieren die Methanogenen Methan über eine „reverse Methanogenese“, mit Wasser als terminalem Elektronenakzeptor (Reaktion 2).

Die bakteriellen Partner würden den bei der Oxidation des Methans entstehenden Wasserstoff verwerten. Ein Interspezies Wasserstofftransfer würde somit die Grundlage dieses Konsortiums bilden. Die Fähigkeit der SRB, Wasserstoff als Elektronendonator sehr effizient zu nutzen (Reaktion 3), würde konstant niedrige *in situ*-Wasserstoffkonzentrationen schaffen, welche die Oxidation von Methan thermodynamisch begünstigen könnten.



Jedoch ist noch offen, ob zwei Organismen in AOM und Sulfatreduktion involviert sind oder ob die gesamte Redoxreaktion von nur einem Organismus ausgeführt wird. Zudem konnte bis heute für kein vorgeschlagenes Intermediat wie Wasserstoff, Acetat, Formiat, Methanol oder Methylamine experimentell gezeigt werden, dass es zwischen sulfatreduzierenden Bakterien und methanotrophen Archaeen ausgetauscht wird (Nauhaus *et al.*, 2002; Nauhaus *et al.*, 2005; Sørensen *et al.*, 2001).

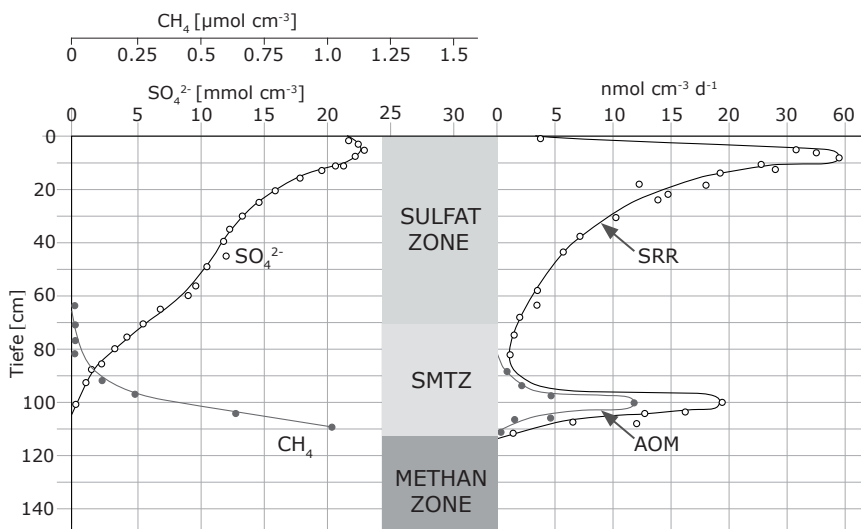


Abb. 2: Typische AOM-assozierte Vertikalprofile

Typische Tiefenprofile der Methan- und Sulfatkonzentration in anoxischen marinen Sedimenten. (links) Sulfat und Methankonzentrationen des Porenwassers. Die Kreuzung der Sulfat- und Methan-konzentrationsprofile kennzeichnet die Sulfat-Methan-Transitionszone (SMTZ). (rechts) Sulfatreduktions- und Methanoxidationsraten. Die AOM-Rate verzeichnet in der SMTZ ein Maximum, in der gleichen Tiefe ist die Sulfatreduktionsaktivität erhöht. Die Methanzone beginnt unterhalb der Tiefe mit Sulfateintrag. (verändert nach Iversen & Jørgensen, 1985)

1.3 AOM-katalysierende Mikroorganismen

Den ersten Beweis zur Existenz anaerober Methanotropher lieferten Hinrichs *et al.* (1999). Durch den geringen ^{13}C -Gehalt extrahierter Archaea-spezifischer Lipidbiomarker konnte als C-Quelle für die Synthese der Lipide das isotopisch leichte Methan identifiziert werden. Orphan *et al.* (2001, 2002) bestätigten durch *in situ* Hybridisierung von 16S rRNA, kombiniert mit sekundärer Ionen-Massenspektrometrie, dass die angefärbten Zellaggregate ihre Biomasse auch aus leichtem Methankohlenstoff aufgebaut haben.

Alle heute bekannten anaeroben Methanotrophen (ANME) sind verwandt mit methanogenen Euryarchaeota (Knittel *et al.*, 2005), bisher konnte jedoch kein einziges Mitglied dieser Gruppe kultiviert werden.

Seit der Entdeckung in den späten 1990er Jahren wurde die Diversität und Verteilung der ANME mit kultivierungsunabhängigen Methoden, die meist auf der Phylogenie von 16S rRNA Genen basieren, intensiv studiert.

Es werden drei Gruppen unterschieden: ANME-1, ANME-2 und ANME-3, die alle nah oder entfernt verwandt mit den Ordnungen *Methanomicrobiales* und *Methanosarcinales* sind. Die phylogenetische Distanz zwischen den unterschiedlichen ANME Vertretern ist groß. Selbst die Ähnlichkeiten innerhalb der ANME-2 Untergruppen (-2a, -2b, -2c) sind vergleichsweise gering.

Methan-Sulfat-Übergangszonen (SMTZ) bilden die ökologische Nische für anaerobe Methanotrophe (Reeburgh, 2007), in ihr werden meist mehrere ANME Vertreter gefunden, jedoch dominiert meist eine der Gruppen. ANME-2 zum Beispiel in der SMTZ von Sedimenten der Eckernförder Bucht oder des Wattenmeers (Ishii *et al.*, 2004) und ANME-1 in der tiefen SMTZ der Tommeliten (Niemann *et al.*, 2005) und des Santa Barbara Beckens (Harrison *et al.*, 2009). Bisherige Studien deuten eine weltweite Verbreitung der ANME-1 und ANME-2 an. Beide Gruppen wurden im natürlichen Lebensraum in Form aggregierter Zellpakete, oft im Verbund mit Bakterien und eingebettet in einer dicken organischen Matrix, gefunden (Knittel & Boetius, 2009). ANME-1 bildet jedoch meist kurze Ketten aus einzelnen Zellen, in Sedimenten des schwarzen Meeres kommen auch lange multizelluläre Ketten von über 100 μm vor (Reitner *et al.*, 2005). Der Großteil der in methanreichen, marinen Sedimenten detektierten ANME-2-Zellen ist mit Deltaproteobakterien der Gattungen *Desulfosarcina/Desulfococcus* (DSS; SEEP-SRB I) assoziiert (z.B. Boetius *et al.*, 2000). Die Untergruppen ANME-2a und ANME-2c können durch die Morphologie der Aggregate unterschieden werden. In den nicht immer sphärischen ANME-2a/*Desulfosarcina*-Konsortien sind beide Zelltypen durchmischt. Bei ANME-2c/DSS dagegen entsteht die bisher bekannte „Schalenstruktur“, bei der die Sulfat-Reduzierer um einen zentralen Bereich aus Archaeen angeordnet sind (Boetius *et al.*, 2000). Die Größe und die Zellzahlen innerhalb der Konsortien variieren stark, jedoch scheint es eine kritische Größe zu geben, nach deren Überschreitung die Kon-

sortien sich auflösen und Einzelzellen in die Umgebung abgegeben werden. ANME-3 wurde bislang hauptsächlich in Sedimenten submariner Schlammvulkane und nur sporadisch in anderen methanreichen Sedimenten gefunden.

Dort kommen ANME-3 als Einzelzellen (Omorgie *et al.*, 2008) vor oder sie bilden Konsortien mit Schalenstruktur. Der sulfatreduzierende Partner gehört meist der Gattung *Desulfobulbus* an (Lösekann *et al.*, 2007). *Desulfobulbus* wurde auch schon zusammen mit ANME-2c detektiert. Diese Tatsache und die vielfältigen Zellmorphologien der Sulfatreduzierer deuten eine Flexibilität der bakteriellen Partner in den AOM-Syntrophien an.

ANME-2d, eine neue Gruppe, nahe verwandt mit ANME-2, wurde als die vierte ANME-2 Untergruppe beschrieben (Martinez *et al.*, 2006; Mills *et al.*, 2005).

Die gleiche Gruppe wurde bereits von Lloyd *et al.* (2006) im Golf von Mexiko entdeckt, aber GoM Arc I genannt, da sie nicht monophyletisch mit den anderen ANME-2 Untergruppen ist. Zudem ist ihre Rolle im Methankreislauf ungewiss, da bisher weder gezeigt werden konnte, dass diese Gruppe AOM katalysiert, noch Konsortien mit SRB bildet.

1.4 Physiologie der AOM-Konsortien

Die erwartete 1:1 Stöchiometrie von AOM konnte in *in vitro* Experimenten durch den Verbrauch von Methan und die gleichzeitige Bildung von Sulfid aus Sulfat in einem annähernd molaren Verhältnis von 1:1, bestätigt werden (Nauhaus *et al.*, 2002). Kontrollexperimente ohne Methan zeigten eine eindeutige Abhängigkeit der Sulfidbildung von Methan. Eine methanunabhängige Sulfidbildung wurde nur in sehr öligen Sedimenten festgestellt, da viele Sulfatreduzierer in der Lage sind, andere Kohlenwasserstoffe als alternative Elektronendonoren zu nutzen (Omorgie *et al.*, 2008; Orcutt *et al.*, 2008).

Die Assoziation von ANME und einem sulfatreduzierenden Partner wird als syntrophe Interaktion interpretiert. Syntrophie ist eine spezielle Form von Symbiose, in der stoffwechselphysiologisch unterschiedliche Mikroorganismen voneinander abhängen, um ein spezifisches Substrat zu degradieren, das keiner der Organismen alleine umsetzen kann (Schink, 1997).

In methanreichen Habitaten beträgt die berechnete Energieausbeute der anaeroben Oxidation von Methan, gekoppelt an die Sulfatreduktion, schätzungsweise $40 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ CH}_4$. Da dieser Energiebetrag von den beiden syntrophischen Partnerorganismen geteilt werden müsste, ist dieser Prozess bekannt als einer der am wenigsten effizienten Stoffwechselforgänge überhaupt (Strous & Jetten, 2004).

Über die biochemische Kopplung von Wachstum und anaeroben mikrobiellen Prozessen mit niedrigem Energieertrag ist bisher wenig bekannt. Bei der anaeroben Methanoxidation wird nur 1 % des umgesetzten Methans für den Bau-

stoffwechsel verwendet, die restlichen 99 % werden zu CO₂ oxidiert. Die Kohlenstoffdioxid-Assimilation über den Acetyl-CoA-Weg stellt eine Möglichkeit dar, den Methankohlenstoff für die Biosynthese zu nutzen.

1.5 Der Einfluss von Umweltparametern auf die Prozessraten

AOM- und Sulfatreduktionsraten sowie das Wachstum von AOM Konsortien ist hauptsächlich von der Verfügbarkeit von Methan und Sulfat abhängig (Girguis *et al.*, 2005; Nauhaus *et al.*, 2007). Der Energiegewinn aus Methan ist für ANMEs nur in der Anwesenheit von Sulfat möglich. Die höchsten AOM-Aktivitäten werden in gashydratreichen sulfatpenetrierten Oberflächensedimenten (Treude *et al.*, 2003) und in oberflächennahen aktiven marinen Schlammvulkanen mit hohen advektiven Methanflussraten gemessen (Dale *et al.*, 2008).

Da sowohl ANMEs als auch die assoziierten Sulfatreduzierer eine anaerobe Lebensweise führen, ist die Verfügbarkeit von Sauerstoff ein weiterer limitierender Faktor. Andere Einflussfaktoren wie Druck, Salinität, Temperatur und der pH-Wert zeigen eine Adaption der Organismen an verschiedene marine Bedingungen. So wurden ANME Populationen auch schon in extremen Habitaten gefunden, zum Beispiel bei Temperaturen über 95 °C in hydrothermalen Sedimenten des Guaymas Beckens (Teske *et al.*, 2002; Kallmeyer & Boetius, 2004) oder in CO₂ gesättigten Sedimenten von Yonaguni Knoll mit einem *in situ* pH-Wert von weniger als 4 (Inagaki *et al.*, 2006).

Allgemein gilt jedoch, dass wegen der steigenden Löslichkeit von Methan eine Druckerhöhung AOM verstärken kann. *In vitro*-Experimente zeigten, dass das Temperaturoptimum für AOM 5-10 °C über der tatsächlichen *in situ*-Temperatur liegt (Boetius *et al.*, 2008). Das pH-Optimum für AOM liegt bei 7-8 und entspricht demnach dem pH-Bereich in marinen Sedimenten (Nauhaus *et al.*, 2005).

1.6 Das Leben in Zellaggregaten

In marinen Sedimenten kommen gemischte mikrobielle Lebensgemeinschaften nicht nur an der Grenzfläche zwischen Sedimentoberfläche und Wassersäule vor. Organisiert in Aggregaten, ist die Besiedlung aller Grenzflächen zwischen Gas- und Flüssigphasen, Flüssig- und Festphasen oder zwischen verschiedenen Flüssigphasen (z.B. Wasser-Öl) möglich, was die Verteilung der Mikroorganismen entlang beträchtlicher Sedimentiefen begünstigt (Battin & Sengschmitt, 1999). Die Zellen in den Aggregaten, auch als Biofilme bezeichnet, werden zusammengehalten durch eine Matrix von extrazellulären polymeren Substanzen (EPS) (Flemming & Wingender, 2001). Die EPS bildet somit die Grundlage für die Entstehung synergistischer Mikrokonsortien, da sie eine längere Verweildauer

von Zellen in einer stabilen Position erst ermöglicht. Bedingt durch die physiologische Aktivität der Organismen, spielt die EPS zudem als Reaktionsraum eine entscheidende Rolle. Zonen verminderter Diffusion werden geschaffen, wodurch der Aufbau von pH-Gradienten und Redoxpotentialen ermöglicht und die Verfügbarkeit von Elektronenakzeptoren/-donoren sichergestellt wird (Flemming *et al.*, 2007). Durch die teilweise oder komplette Immobilisierung von Exoenzymen in der unmittelbaren Umgebung der Zelle kann zudem die Effizienz des Abbaus, von beispielsweise partikulärem Material, deutlich verbessert und die Aufnahme von Spaltprodukten begünstigt werden. Die am besten untersuchten Beispiele sind die syntrophen Beziehungen anaerober Bakterien und der Co-Metabolismus beim Abbau von Schadstoffen (Noguera *et al.*, 1999). Gleichzeitig können für bestimmte Gruppen ökologische Nischen durch lokal veränderte Umweltbedingungen (z.B. anaerobe Bereiche in tieferen Biofilmschichten) entstehen. Ferner bietet der Biofilm einen gewissen Schutz vor hydraulischen Belastungen, osmotischem Stress und Bioziden. Es wurde gezeigt, dass identische Spezies bis zu 1000-fach resistenter gegenüber Antibiotika und Bioziden sind als die planktonischen Zellen (Ceri *et al.*, 1999).

Marine Biofilme sind, bedingt durch die biologische Diversität und die molekulare Komplexität, Gegenstand der aktuellen Forschung. Aufgrund der durch sie hervorgerufenen Materialschäden nehmen sie eine besondere Rolle ein. Marine Biofilme verursachen jährlich milliardenschwere Kosten in der internationalen Schifffahrt und der maritimen Industrie (z.B. Offshore-Plattformen, Aquakultur), wo der Oberflächenbewuchs (Biofouling) Fahrt- und Pumpwiderstände erhöht sowie Metalle und andere Materialien korrodiert. Bei der Suche nach effizienteren und vor allem umweltschonenden Antifouling-Substanzen werden seit einigen Jahren verstärkt die molekularen Interaktionen in natürlichen Biofilmgemeinschaften mit einbezogen (Matz, 2009).

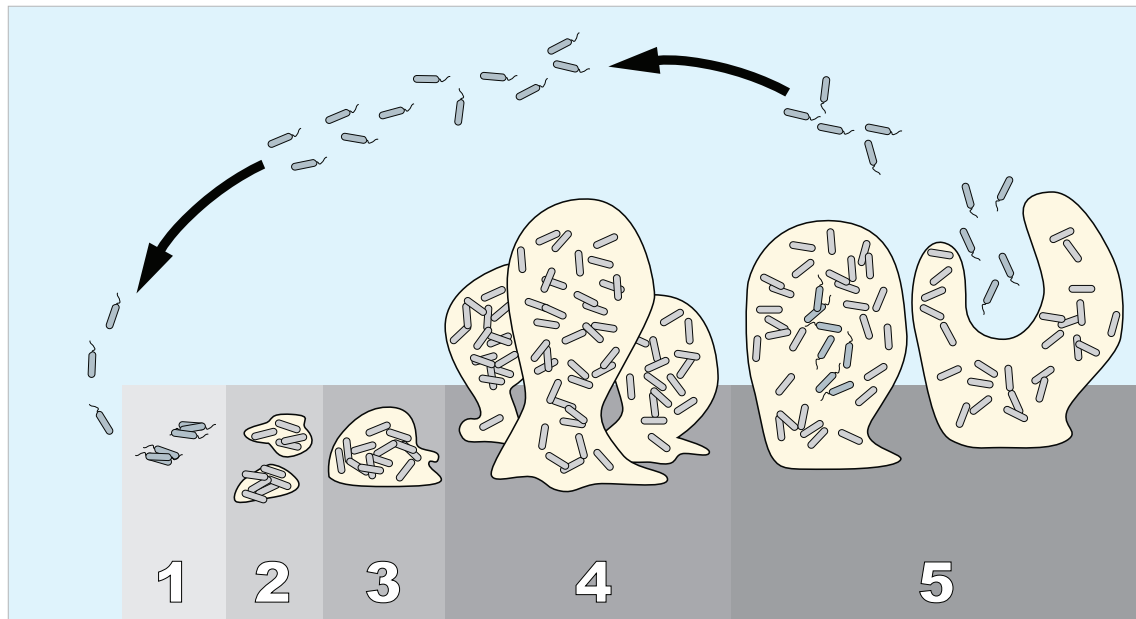


Abb.3 Schematische Darstellung der Entstehung eines Biofilms

- (1) Initiale reversible Adhäsion frei beweglicher planktonischer Zellen an eine Oberfläche
- (2) irreversible Adhäsion - Verlust von Flagellen und die Ausscheidung von Exopolymersubstanzen führen zur Bildung von Mikrokolonien (*Quorum sensing*-abhängiger Schritt)
- (3)+(4) Reifung I+II - Aufbau eines heterogenen dreidimensionalen Biofilms (*QS*-abhängiger Schritt)
- (5) Einstellung des Gleichgewichts zwischen Zuwachs und Abbau (*QS*-abhängiger Schritt)

1.7 Mikrobielle Kooperation über chemische Kommunikation

Die Entstehung und Anordnung von Zellen in Biofilmen und Aggregaten obliegen hydrodynamischen Kräften und der Fähigkeit von Mikroorganismen zur inner- und zwischenartlichen Kommunikation und Interaktion (van Loosdrecht *et al.*, 1997). Die Fähigkeit von Bakterien untereinander zu kommunizieren wird als *Quorum sensing* (*QS*) bezeichnet und basiert auf der Detektion der Zelldichte, über niedermolekulare Signalmoleküle (Autoinducer), die in der Umgebung akkumulieren und deren Konzentration wahrgenommen werden können (Eberhard, 1972; Parsek & Greenberg, 2005). Eine spezifische Genexpression in Abhängigen von der Populationsdichte ist die Folge (Camilli & Bassler, 2006; Williams, 2007).

QS stellt den Regulationsmechanismus für eine Vielzahl zellulärer Prozesse wie Differenzierung, Sporulation, DNA-Transfer und Antibiotika-Produktion dar (Fuqua *et al.*, 1994; Miller & Bassler, 2001). Parsek & Greenberg (2005) konnten zeigen, dass auch der Aufbau eines dreidimensionalen Biofilms an einer Grenzfläche *QS* abhängig ist. Als Folge der Oberflächenadsorption organischer Makromoleküle (Proteine, Polysaccharide etc.) finden sich in kürzester Zeit Bakterien ein, die sich mittels Geißeln (Flagellen) und Proteinfäden (Fimbrien, Pili) anheften. *QS* steuert den Verlust der Zellanhefte und die Absonderung von ex-

trazellulären polymeren Substanzen (EPS), wodurch Bakterien zu Mikrokolonien heranwachsen und strukturierte Zellaggregate bilden (siehe Abb. 3).

Gram-negative Bakterien nutzen als Signalmoleküle hauptsächlich frei diffundierbare N-Acyl-Homoserin-Lactone (AHL), die sich in ihrer Seitenkettenlänge und -substitution unterscheiden und dadurch spezifisch für verschiedene Spezies sein können (Eberl, 1999; Miller & Bassler, 2001). Diese Signalmoleküle werden von einer spezifischen AI-Synthase (LuxI) produziert. Ein Rezeptor, der als Transkriptionsaktivator fungiert (LuxR), detektiert die Signalmoleküle ab einem bestimmten Schwellenwert und induziert infolge die Expression bestimmter Zielgene. LuxR/LuxI-homologe QS-Systeme sind ubiquitär verbreitet, die meisten Bakterien mit diesen Systemen verwenden mehrere AHLs und besitzen mehr als eine AHL-Synthetase (Williams *et al.*, 2007).

Das interspezifische QS-System mit dem Autoinducer-2 Signalmolekül ermöglicht es dem marinen Bakterium *V. harveyi*, neben der eigenen Populationsdichte auch die der anderen AI-2-synthetisierenden Bakterienpezies in ihrer lokalen Umgebung wahrzunehmen (Miller & Bassler, 2001; Federle & Bassler, 2003). Dabei nimmt AI-2 als Signalmolekül eine Sonderrolle ein, es wird nicht von einer spezialisierten Synthase hergestellt, sondern ist das Nebenprodukt der Regeneration von S-Adenosyl-L-Methionin (SAM), dem zentralen Methyldonor in der Zelle (Vendeville *et al.*, 2005). Das betreffende Enzym, S-Ribosyl-L-Homocysteinase (LuxS), bildet eine Vorstufe von AI-2, und zwar 4,5-Dihydroxy-2,3-Pentandion (DPD).

Das weit verbreitete bakterielle Signalmolekül AI-2 stellt wahrscheinlich ein interspeziespezifisches System der Zell-Zell-Kommunikation dar (Bassler *et al.*, 1997). Es informiert die Zelle über die Dichte und phylogenetische Zusammensetzung der umgebenden bakteriellen Gemeinschaften und könnte auch involviert in die Entstehung der engen assoziierten Lebensgemeinschaften anaerober methanotropher Archaeen (ANME) und sulfatreduzierender Bakterien (SRB) sein. Über die Zell-Zell-Kommunikation der Archaeen ist bislang nichts bekannt. Für *δ-Proteobacteria* und auch andere SRB konnten bislang zwar keine AHLs nachgewiesen werden, jedoch konnten in heterogenen Bakterienmatten mit SRBs diverse AHLs identifiziert werden (Decho *et al.*, 2009). Zudem wurden bei einigen Vertretern LuxI- und auch LuxS-Homologe gefunden (Kawaguchi *et al.*, 2008).

Unter diesem besonderen Hintergrund stellt sich die Frage, in wieweit die Gemeinschaften durch intra- und interspeziespezifische Signalmoleküle miteinander kommunizieren und über QS-gesteuerte Prozesse beeinflusst werden.

1.8 Quorum Quenching

Neben Sedimenten und Felsen besiedeln Biofilme auch die belebten Oberflächen vieler Tiere und Pflanzen (Epibiose). Marine Tiere und Pflanzen sind dem ständigen Risiko ausgesetzt, durch Epibionten regelrecht überwuchert zu werden. Eine Strategie, die Besiedlung abzuwehren, ist die Produktion von Antifouling Substanzen. Ein prominentes Beispiel ist die australische Rotalge *Delisa pulchra*, die sich durch die Freisetzung von halogenierten Furanonen, vor dem Bewuchs durch marine Bakterien schützt (Givskov *et al.*, 1996). Halogenierte Furanone in ihrer Struktur den AHLs und vor allem AI-2 erstaunlich ähnlich, binden an die AHL-Rezeptorproteine der LuxR-Familie in den bakteriellen *Quorum Sensing*-Systemen (Ren *et al.*, 2001). Das Blockieren der Kommunikation zwischen Bakterien führt zu einer Störung überlebenswichtiger ökologischer Funktionen, unter anderem werden Bakterien in Anwesenheit von QS-Antagonisten in ihrer Verteidigung gegenüber Fraßfeinden geschwächt (Manefield *et al.*, 2002). Weitergehend konnte gezeigt werden, dass Furanon-Verbindungen auch bei den Spezies *E. coli* und *P. aeruginosa* das Schwärmverhalten und die Biofilmbildung inhibieren (Hentzer *et al.*, 2002; Ren *et al.*, 2002). Auch marine Tiere produzieren AHL-Antagonisten, um die Biofilmbildung einzudämmen, wie beispielsweise bromierte Alkaloide, die aus dem Blättermoostierchen *Flustra foliacea* isoliert wurden (Peters *et al.*, 2003).

Die Inhibition von *Quorum Sensing* kann durch unterschiedliche Mechanismen erfolgen. Möglichkeiten sind die chemische oder enzymatische Inaktivierung der Signalmoleküle, die Blockierung des AHL-Rezeptorproteins durch antagonistische Moleküle oder auf Transkriptionsebene mit sogenannten Small RNAs.

Die Degradierung von AHL durch QQ-Proteine ist in natürlichen Lebensräumen weit verbreitet, jedoch sind die Gründe für die Entwicklung der QS-Inhibitoren noch größtenteils unbekannt. Einige Daten deuten an, dass die Produkte, die bei der Degradierung von AHL entstehen als N-/C-Quelle und als Energiereservoir genutzt werden können (z.B. Yang *et al.*, 2006). Dadurch könnten Bakterien in nährstoffarmen Habitaten das Überleben sichern.

QS-Inhibitoren können in bakteriellen Interaktionen aber auch als erfolgreiche Waffen im Wettkampf um limitierte natürliche Ressourcen eingesetzt werden (Dong *et al.*, 2004). Sie können Bakterien aber auch als Überlebensstrategie dienen: 3-oxo-AHLs können eine Claisen-Umlagerung vollziehen, die in Tetramsäurederivaten resultiert. Beide Stoffe sind giftig für Gram-positive Bakterien, jedoch nicht für Gram-negative Bakterien (Kaufmann *et al.*, 2005). AHL Lactonasen könnten demnach von Gram-Positiven exprimiert werden, um im natürlichen Lebensraum zu bestehen.

1.9 Metagenomik

Der Erforschung chemischer Interaktionen in marinen Biofilmen stellt sich jedoch das Problem der nahezu uneingeschränkten Komplexität der Gemeinschaften und der eingeschränkten Kultivierbarkeit ihrer Mitglieder. Ein viel versprechender Ansatz ist dabei die Anwendung ganzheitlicher Analysemethoden wie der Metagenomik. Mit dem Einsatz der Metagenomik, bei der Gesamt-DNA direkt aus Umweltproben oder komplexen Anreicherungskulturen isoliert und als rekombinante Genbibliothek (Metagenombank) in heterologen Wirten exprimiert wird, steht das genetische Material von nicht kultivierbaren Organismen für funktionelle Analysen zur Verfügung (Steele *et al.*, 2009; Hugenholtz, 2008; Handelsmann, 2004). Für die Durchmusterung der Metagenombanken können grundsätzlich zwei Wege beschrrieben werden. Sie kann zum einen auf der Basis von Sequenzähnlichkeiten durchgeführt werden (Knietsch *et al.*, 2003). Hierdurch gelingt es, neue Proteine bekannter Proteinfamilien oder funktioneller Klassen zu identifizieren. Besonders vielversprechend ist zum anderen die aktivitätsbasierte Durchmusterung, bei der z.B. durch Verwendung von Plattentests die Standort-Genbank nach der gewünschten Aktivität durchsucht wird. Hierdurch können strukturell neue biologisch aktive Moleküle entdeckt werden. Mit Hilfe dieser Technik wurden bereits viele neue biologisch aktive Moleküle identifiziert (Elend *et al.*, 2006; Williamson *et al.*, 2005; Voget *et al.*, 2003). Dabei steht die Identifizierung von Eigenschaften im Vordergrund, die medizinische oder industrielle Bedeutsamkeit haben, wie beispielsweise neuartige Enzyme für einen weiten Anwendungsbereich zu finden (Streit & Schmitz, 2004). Künftige Erkenntnisse über marine Biofilme bergen aber nicht nur das Potential neuartige Wirkstoffe hervorzubringen, sondern auch Einblicke in das molekulare Wechselspiel mariner Habitats zu erlangen.

1.10 Ziele dieser Arbeit

Im Rahmen des West Nil Delta (WND)-Projekts (Leibniz Institut für Meereswissenschaften, IFM-GEOMAR) wurden an dem Schlammvulkan North Alex unter anderem biogeochemische Untersuchungen durchgeführt. Die Verbindung zwischen Methanaustritt und biologischen Prozessen, die mit Methan gekoppelt sind, stehen im Vordergrund. Um den Kontrollmechanismus der Methanemission in solchen Ökosystemen besser zu verstehen, wurden in der vorliegenden Arbeit Sedimentproben des North Alex Schlammvulkans untersucht.

Im ersten Teil dieser Arbeit sollten mikrobielle AOM- und Sulfatreduktionsraten des North Alex Schlammvulkans bestimmt und die Temperaturabhängigkeit des Prozesses untersucht werden.

Diese wurden im zweiten Teil ergänzt, durch eine Analyse der Diversität und

Struktur mikrobieller Lebensgemeinschaften in Sedimenten des Kraterzentrums, die an geologische und biogeochemische Prozesse der Gas- und Flüssigkeitsausstritte gekoppelt sind. Durch die Erstellung bakterieller und archaeeller 16S rDNA-Genbanken sollten die am Methanumsatz beteiligten Fraktionen der benthischen Lebensgemeinschaft identifiziert und durch Einsatz von „Catalyzed Reporter Deposition Fluorescence *in situ* hybridization“ die Zusammensetzung der mikrobiellen Lebensgemeinschaft visualisiert und quantifiziert werden.

In einem dritten Schwerpunkt sollten durch den metagenomischen Ansatz QS- und QQ-Strategien dieser mikrobiellen Konsortien untersucht werden.

Zur Verdeutlichung des Forschungsvorhabens ist in Abb. 4 eine schematische Übersicht der geplanten Experimente dargestellt.

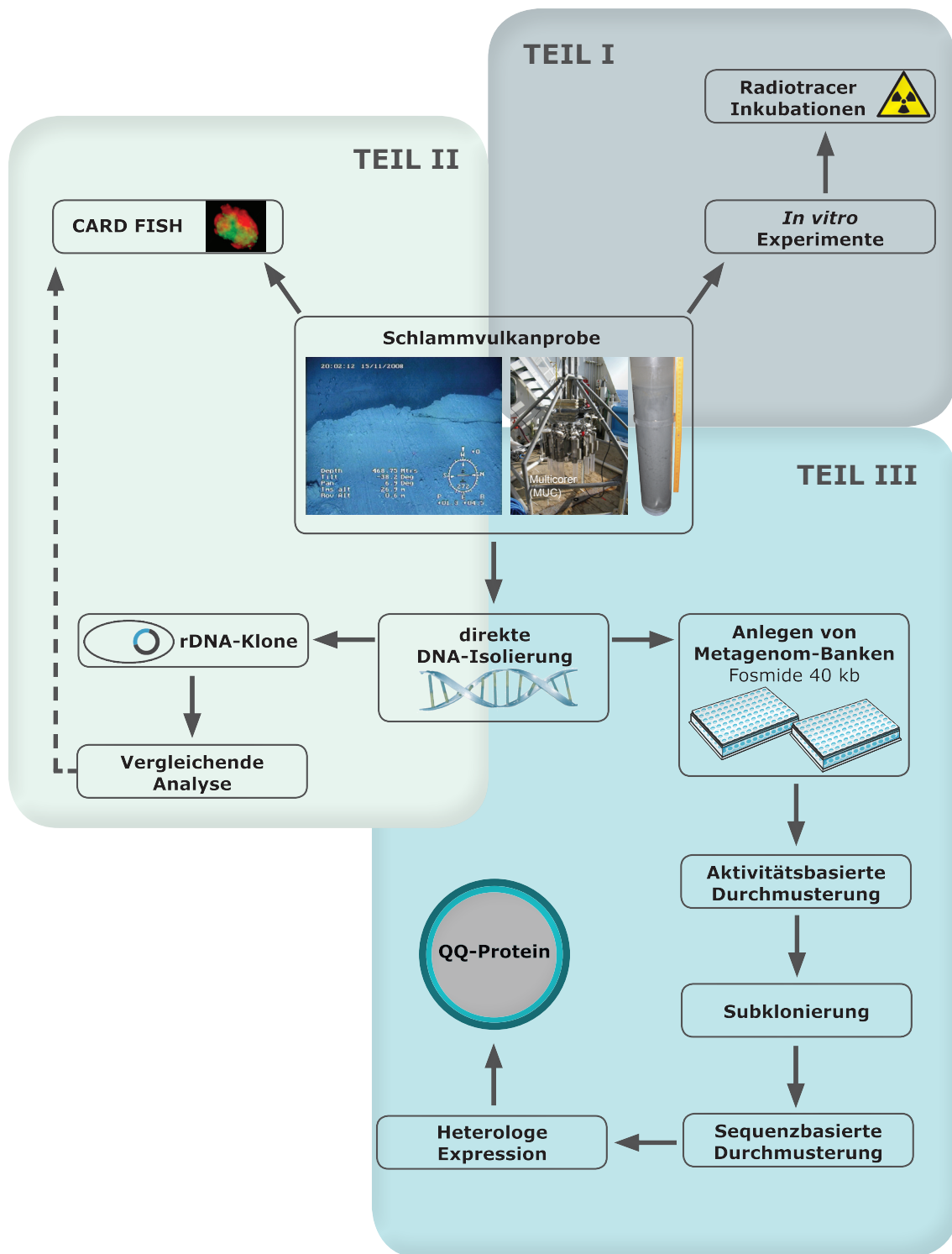


Abb. 4: Schematische Übersicht der durchgeführten Experimente

Teil I: Prozessratenbestimmung durch *in vitro*- und Radiotracer-Experimente und Bestimmung des Temperaturoptimums der methanabhängigen Sulfatreduktion
 Teil II: Phylogenetischer Ansatz zur kultivierungsunabhängigen Untersuchung und Visualisierung mikrobieller Lebensgemeinschaften in Schlammvulkanproben
 Teil III: Metagenomischer Ansatz zur Identifizierung und Herstellung von QQ-Proteinen

2. MATERIAL & METHODEN

2.1 Untersuchungsgebiet - North Alex Schlammvulkan (NAMV)

Charakterisierung des untersuchten Ökosystems

Das Nildelta stellt das Mündungsdelta des afrikanischen Nils dar. Flüsse transportieren enorme Sedimentmengen unterschiedlichster Art, die in die Ozeane gelangen. Sie haben die höchste Transportkapazität und führen dem Meer pro Jahr eine Sedimentfracht an festen und gelösten Substanzen von ungefähr 25 Milliarden Tonnen zu (Siever, 2003). Ausgehend von der Mündung der Flüsse breiten sich Tiefseefächer aus. Der Tiefseefächer im Nildelta ist die wichtigste Sedimentakkumulation im östlichen Mittelmeer. Morphologische Details konnten durch die Erstellung bathymetrischer Karten aufgeklärt werden (Masclé *et al.*, 2001; Loncke *et al.*, 2002, 2004) und führten zur Entdeckung von verschiedenen kreisförmigen Sedimentstrukturen, mit einigen Kilometern Durchmessern und wenigen 10er Metern Höhe, am Oberhang dieses Tiefseefächers.

Der aktive North Alex MV ($31^{\circ}58.19'N$ and $030^{\circ}08.21'E$) als Teil dieser Oberflächenformationen im westlichen Bereich des Nil-Tiefseefächers, fördert Methan und höhere Kohlenwasserstoffe aus Tiefen von ca. 3-4 km. Er ist 30 nautische Meilen (nmi) von der Ägyptischen Küste entfernt (Abb. 5A) und befindet sich in einer Wassertiefe von ca. 500 m, innerhalb einer Caldera-ähnlichen Struktur, mit einem Durchmesser von weniger als zwei Kilometern. Die Kraterhöhe beläuft sich am höchsten Punkt auf fast 50 m (Abb. 5B).

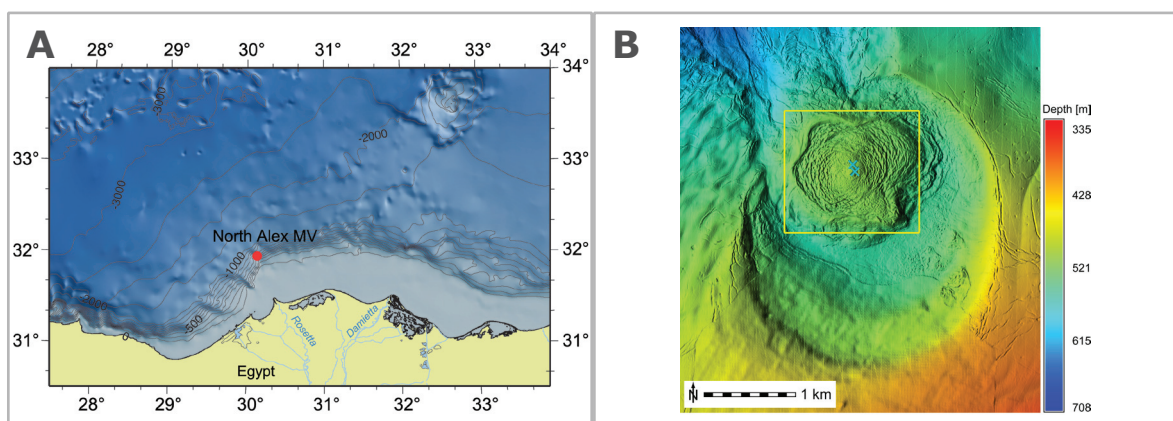


Abb. 5: Untersuchungsgebiet North Alex MV

(A) Lokalisierung des North Alex Schlammvulkans im westlichen Nildelta
 (B) Bathymetrische Karte des North Alex MV. Eingezeichnet sind die mit dem Multicorer beprobten, in dieser Arbeit untersuchten Stationen MUC 4 und MUC 10. H0802-7 und H0804-5 markieren die Stationen mit den für diese Arbeit relevanten Temperaturprofilen.

Zentrum des NAMV

Am North Alex MV konnten über bestimmte Sedimentbereiche die Freisetzung von Methan in die Wassersäule und die Ansiedlung typischer Lebensgemeinschaften, die auf der Primärproduktion schwefeloxidierender und methanotropher Mikroorganismen basieren, beobachtet werden. Der gasreiche Zentralbereich des Schlammvulkans ist durch die Bedeckung des Meeresbodens mit weißen Matten filamentöser Schwefelbakterien (*Beggiatoa spp.*) und symbiontischen Muscheln (*Calyptogena spp.*) markiert (Abb. 6A). Diese Organismen gelten als Indikator für AOM in methanreichen Habitaten. Schwefelbakterien nutzen das durch AOM produzierte Sulfid zur Oxidation zu Sulfat. Sauerstoff aus der Wassersäule dient bei diesem katabolischen Prozess als terminaler Elektronenakzeptor. Die Muschel *Calyptogena* beherbergt Schwefelbakterien in ihren Kiemen. Die Aufnahme von Schwefelwasserstoff erfolgt über ihren verlängerten Fuß, den sie tief in das Sediment hineinsteckt. Sauerstoff wird aus dem Wasser mittels eines Siphons aufgenommen.

Die in dieser Arbeit untersuchten Multicorer Sedimentkerne MUC 4 (Abb. 6B) und MUC 10 stammen aus dem Kraterzentrum und zeigten alle Anzeichen für AOM - eine grau-schwarze Färbung als Indikator für die Anwesenheit von Eisensulfiden, einen starken Geruch von Schwefelwasserstoff, eine gasdurchsetzte Konsistenz und Präzipitationen von authigenem Carbonat.

Die entsprechenden *in situ* Temperaturprofile (Abb. 6C) zeigen für MUC 4 einen sehr steilen Temperaturgradienten von $7,09 \text{ }^\circ\text{C m}^{-1}$ (mündliche Mitteilung T. Feseker). Das bedeutet einen Temperaturanstieg von $13,78 \text{ }^\circ\text{C}$ (Bodenwasser) auf $56,32 \text{ }^\circ\text{C}$ innerhalb der ersten sechs Meter und ist ein Indiz für die hohe Aktivität von North Alex an der Probennahmestelle. Das dazugehörige Temperaturprofil von dem 75 m entfernt genommenen Sedimentkern MUC 10 zeigte einen deutlich geringeren Temperaturgradienten von $2,04 \text{ }^\circ\text{C m}^{-1}$. Im Gegensatz zu anderen bekannten Schlammvulkanen (z.B. Håkon Mosby) zeigt North Alex die höchsten AOM-Aktivitäten im sehr aktiven Zentrum, mit abnehmenden Raten zum Kraterrand hin (Treude, unveröffentlicht). Die höchsten mikrobiellen Umsatzraten für Methan und Sulfat (Abb. 6D+E) wurden in oberflächennahen Sedimenten von MUC 4 gemessen und liegen damit im mittleren Größenbereich von Schlammvulkanen und Gaskaminen („gas chimneys“) (Niemann *et al.* 2006, Omoregie *et al.* 2008). Für MUC 10 liegen keine AOM- und SR-Raten vor.

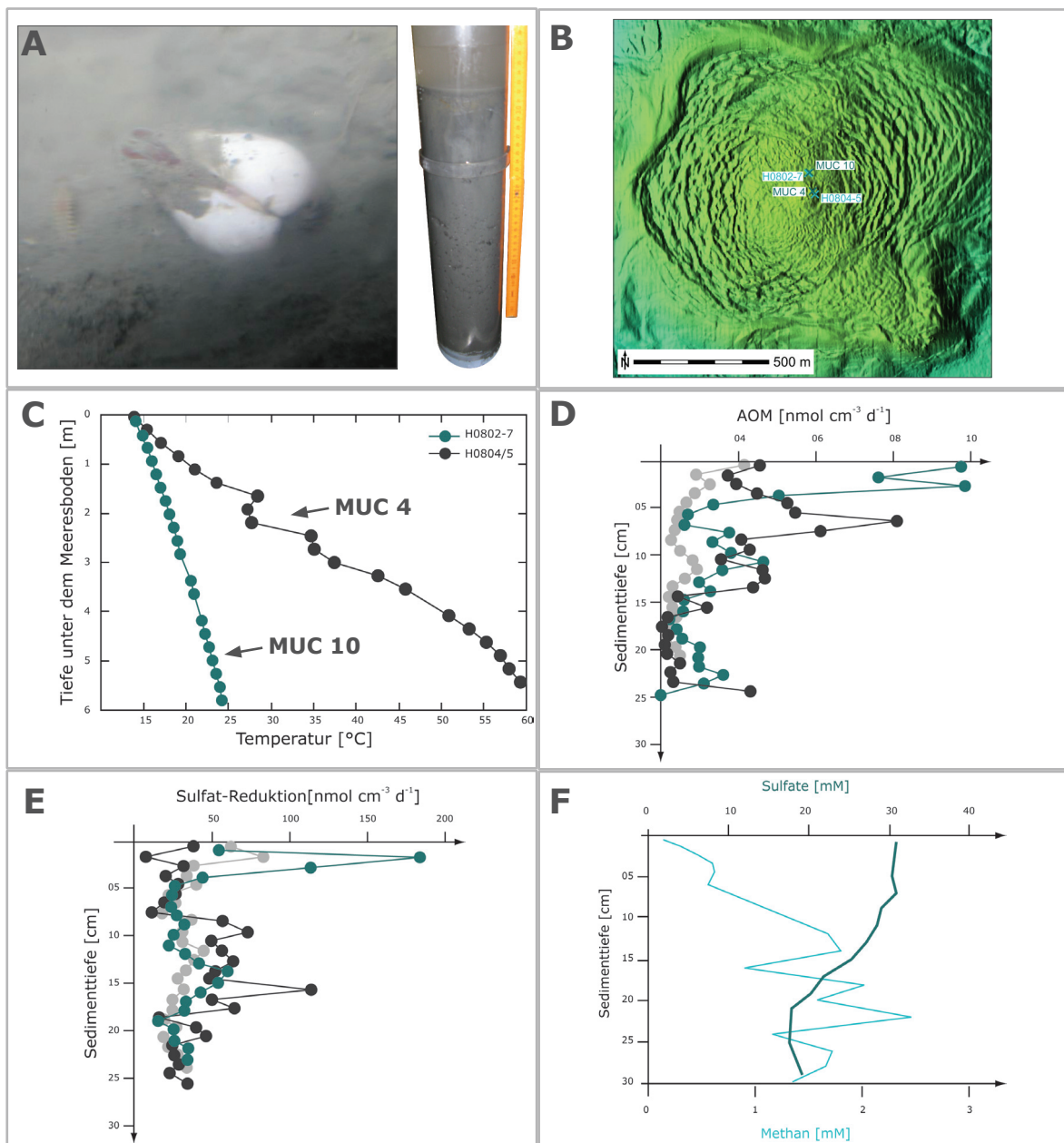


Abb.6: Charakteristika des Untersuchungsgebiets North Alex MV

(A) Chemosynthetische Muschel *Calyptogena* spp. (links) und der, auf Grund von Eisensulfiden, stark reduzierte Sedimentkern MUC 4 (rechts).

(B) Bathymetrische Karte des North Alex MV. Eingezeichnet sind die mit dem Multicorer beprobten, in dieser Arbeit untersuchten Stationen MUC 4 und MUC 10. H0802-7 und H0804-5 markieren die Stationen mit den für diese Arbeit relevanten Temperaturprofilen.

(C) *In situ* Temperaturprofile, von einer Temperaturlanze in unmittelbarer Nähe der Stationen MUC 4 und MUC 10 aufgenommen (Daten freundlicherweise von Tomas Feseker (IFM GEOMAR) zur Verfügung gestellt.)

(D) Tiefenprofil der AOM-Raten von MUC 4 durch Radiotracer Inkubationen mit ^{14}C -markiertem Methan erstellt

(E) Tiefenprofil der SR-Raten von MUC 4 durch Radiotracer Inkubationen mit ^{35}S -markiertem Sulfat erstellt

(F) Tiefenprofil der Methan und Sulfatkonzentrationen im Porenwasser

(D-E; Daten freundlicherweise von Tina Treude (IFM GEOMAR) zur Verfügung gestellt.)

Probennahme

Die in dieser Arbeit untersuchten Sedimentproben stammen von der Forschungs- fahrt WND-3/ 64PE298 des niederländischen Forschungsschiffs R/V PELAGIA (NIOZ) im Jahr 2008 zum Schlammvulkan North Alex im westlichen Nildelta. Sedimente des Kraterzentrums wurden mit dem Multicorer (Kerne von 40 cm Länge) beprobt. An Bord wurden Unterproben der Sedimentkerne, in Schicht- intervallen von 1-2 cm, genommen. Für nachfolgende CARD-FISH-Experimente wurden die Unterproben (MUC 4) mit 4 % (v/v) Formaldehyd fixiert, in PBS/ Ethanol gelagert und bei -20 °C aufbewahrt. Die Unterproben (MUC 4) zur DNA- Isolierung für die 16S rDNA-Analyse und zur Konstruktion der Metagenombank wurden unbehandelt bei -80 °C gelagert. Für *in vitro* Experimente und Radio- tracer-Inkubationen wurde der Sedimentkern (MUC 10) in die Tiefenabschnitte 0-2, 2-5 und 5-10 cm unterteilt, in Glasflaschen transferriert und mit einem Gummistopfen gasdicht verschlossen. Der Transport der Proben und die Lage- rung bis zur weiteren Verwendung erfolgten gekühlt, bzw. gefroren. In Tabelle 1 sind die in dieser Arbeit verwendeten Sedimentkerne und die durch- geführten Experimente aufgelistet.

Tab. 1: Sedimentproben und Untersuchungsmethoden

Kern	Sediment- schicht [cm]	16S rDNA	CARD FISH	QS	QQ	<i>in-vitro</i> Exp.	AOM	SR
MUC 10	2-5 cm			x	x	x	x	x
MUC 10	5-10 cm							
MUC 4	0-1 cm	x	x					
MUC 4	4-5 cm	x	x	x	x			
MUC 4	29-31 cm	x	x					

2.2 Organismen und Plasmide

Die in der Arbeit verwendeten Bakterienstämme und Plasmide sind in Tabelle 2 und 3 aufgelistet. Für die Detektion von QS-/QQ-Aktivität wurden *Chromobacterium violaceum*, *E. coli* DH5 α /pRS354 und *E. coli* DH5 α /pRS356 zur Verfügung gestellt. *C. violaceum* CV026 synthetisiert durch gentechnische Veränderungen keine AHL-Signalmoleküle, ist aber in der Lage kurzkettige, unsubstituierte AHL-Signalmoleküle (vor allem C6-HSL) nachzuweisen (Mc Clean *et al.*, 1997) In Anwesenheit dieser Signalmoleküle wird die Violaceinproduktion angeregt. *E. coli* DH5 α /pRS354 und *E. coli* DH5 α /pRS356 enthalten ein Reportergenkonstrukt mit einem letalen Gen, welches hinter einen durch AHL (3-oxo-HSL) bzw. AI-2 induzierbaren Promotor geschaltet ist (Weiland & Schmitz-Streit, unveröffentlicht). In Anwesenheit der entsprechenden Signalmoleküle kann der Reporterstamm auf Grund der Anreicherung des letalen Proteins nicht wachsen. Sind Moleküle vorhanden, die mit dem Signalmolekül interferieren wird der Promotor nicht induziert, das letale Gen nicht abgelesen und der Stamm kann wachsen.

Tab. 2: In dieser Arbeit verwendete Bakterienstämme

Bezeichnung	relevanter Genotyp	Referenz
<i>Escherichia coli</i> DH5 <i>a</i>	F ϕ 80/ <i>lacZ</i> Δ M15 <i>recA1</i> Δ (<i>lacZYAargF</i>) U169 <i>deoR endA1 hsdR17</i> (<i>r_k⁻ m_k⁺</i>) <i>phoA supE44</i> λ^- <i>thi-1 gyrA96 relA1</i>	Hanahan <i>et al.</i> , 1983
<i>Escherichia coli</i> EPI300 TM -T1 ^R	F $^-$ <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) ϕ 80/ <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74 recA1 endA1 araD139 Δ(<i>ara,leu</i>)7697 <i>galU galK</i>λ^- <i>rpsL nupG trfA tonA dhfr</i></i>	Epicentre, Oldendorf
<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3)	F $^-$ <i>dcm ompT hsdS</i> (<i>r_B⁻ m_B⁻</i>) <i>gal I</i> (DE3)	Stratagene, Heidelberg
<i>E. coli</i> DH5 α /pRS354	<i>E. coli</i> DH5 α -Derivat	Weiland & Schmitz-Streit (unveröffentlicht)
<i>E. coli</i> DH5 α /pRS356	<i>E. coli</i> DH5 α -Derivat	Weiland & Schmitz-Streit (unveröffentlicht)
<i>Chromobacterium violaceum</i> CV026	<i>luxI</i> :Tn5-Mutante	Mc Clean <i>et al.</i> , 1997

Tab. 3: In dieser Arbeit verwendete Plasmide

Plasmide	relevanter Eigenschaften	Referenz
pCC1FOS™	Fosmid	Epicentre, Oldendorf
pCR®II-TOPO®	Klonierungsvektor für <i>E. coli</i> , <i>Amp^R</i>	Invitrogen, Karlsruhe
pDrive	Klonierungsvektor für <i>E. coli</i> , <i>Amp^R</i>	Qiagen, Hilden
pMAL™-c2X	Expressionsvektor von MBP-Fusionsproteinen	New England Biolabs GmbH, Schwalbach
pRS628	QQ-ORFs des Subklons 79/E4 E, <i>Amp^R</i>	diese Arbeit
pRS629	QQ-ORFs des Subklons 37/F10 E, <i>Amp^R</i>	diese Arbeit
pRS630	<i>malE</i> -QQ-ORF unter der Kontrolle des <i>ptac</i> ; <i>Amp^r</i> , <i>Tet^r</i>	diese Arbeit

2.3 Oligonukleotide und Kits

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 4 aufgeführt und wurden bei der Firma MWG-Biotech (Ebersberg) synthetisiert.

Tab. 4: In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide

Bezeichnung/ Richtung	Sequenz 5´-3´	Verwendung	Herkunft
16S Bac/for	AGAGTTTGATCCTG GCTCAG	Amplifikation des 16S rRNA- Fragments der <i>Bacteria</i>	(Orphan et al. 2001)
16S Bac/rev	GGTACCTTGATC GACTT	Amplifikation des 16S rRNA- Fragments der <i>Bacteria</i>	(Orphan et al. 2001)
16S Arch/for	TTCGGTTGATC CYGCCRG	Amplifikation des 16S rRNA- Fragments der <i>Archaea</i>	(Orphan et al. 2001)
16S Arch/rev	TCCGGCGTTGAMTC CAATT	Amplifikation des 16S rRNA- Fragments der <i>Archaea</i>	(Orphan et al. 2001)

Bezeichnung/ Richtung	Sequenz 5`-3`	Verwendung	Herkunft
M13/for	GTAAAACGACGGC CAG	Sequenzierung von 16S rDNA- Klonen und Sub- klonen	Invitrogen, Karlsruhe
M13/rev	AGAGTTTGATCCT GCTCAG	Sequenzierung von 16S rDNA- Klonen und Sub- klonen	Invitrogen, Karlsruhe
37F10_1/rev	GAATTCTCACATATG CTGTATCCAG	<i>Primer walking</i>	diese Arbeit
37F10_2/rev	GAATTCTTACCGCGG CGCCATA	<i>Primer walking</i>	diese Arbeit
37F10_3/rev	GAATTCATGCTGGGC ATACAGTTC	<i>Primer walking</i>	diese Arbeit
37F10_4/for	GAATTCATGAAATTC ACTGATATTG	<i>Primer walking</i>	diese Arbeit
37F10_5/for	CGATCCTGATCTCGG GGCAGG	<i>Primer walking</i>	diese Arbeit
37F10_6/for	GGGTATTGACTTCT GACTCG	<i>Primer walking</i>	diese Arbeit
79E4_1/rev	GAATTCATGAGACAC CATGAGGATT	<i>Primer walking</i>	diese Arbeit
79E4_2/rev	GGATCCTTATTCGGC GGCAGG	<i>Primer walking</i>	diese Arbeit
79E4_3/rev	GGATCCTCAGCGTGC CTCGTC	<i>Primer walking</i>	diese Arbeit
79E4_4/for	GGATCCTTATTGGTT TTTATTTTCG	<i>Primer walking</i>	diese Arbeit
79E4_5/for	GGATCCTCATCTCCC CCTCGAC	<i>Primer walking</i>	diese Arbeit
79E4_6/rev	CAGAGGCGGTAGTAG AGATC	<i>Primer walking</i>	diese Arbeit

Tab. 5: In dieser Arbeit verwendete Kits

Kit	Bezugsquelle
CopyControl™ Fosmid Library Produc- tion	Epicentre (Oldendorf)
NucleoSpin® Extract II	Macherey-Nagel (Düren)
NucleoSpin® Plasmid QuickPure	Macherey-Nagel (Düren)
TOPO TA Cloning®	Invitrogen (Karlsruhe)
QIAEX II Gel Extraction	Qiagen (Hilden)
SoilMaster™ DNA Extraction Kit	Epicentre (Oldendorf)
TSA™ Kit #22/ #23	Invitrogen (Karlsruhe)

2.4 Chemikalien und Biochemikalien

Soweit nicht anders vermerkt, wurden Chemikalien der Firma Carl Roth GmbH + Co (Karlsruhe) mit dem Reinheitsgrad „p.a.“ oder „reinst“ verwendet. Die Gase wurden von der Firma Air Liquide Deutschland GmbH (Düsseldorf) bezogen. Die Restriktionsenzyme stammten von den Firmen New England Biolabs (Schwalmbach) und MBI Fermentas (St. Leon-Rot). Darüber hinaus fanden die Chemikalien und Enzyme folgender Firmen Verwendung:

Tab. 6: In dieser Arbeit verwendete Chemikalien und Enzyme

Substanz	Bezugsquelle
Agarose	Invitrogen (Karlsruhe)
Ampicillin	Gerbu (Gaiberg)
Bromphenolblau	Serva (Heidelberg)
Chloramphenicol	Gerbu (Gaiberg)
Glycerin	Merk (Darmstadt)
Glycogen	Fermentas (St. Leon-Rot)
4-Hydroxy-5-methyl-3-furanone	Sigma-Aldrich (Steinheim)
IPTG	Gerbu (Gaiberg)
Kaliumacetat	Merk (Darmstadt)
Kaliumchlorid	Merk (Darmstadt)
Kanamycin	Gerbu (Gaiberg)
N-(β -Ketocaroyl)-L-homoserine lactone	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Resazurin	Sigma-Aldrich (Steinheim)
X-Gal	Gerbu (Gaiberg)
ZnCl ₂	VWR (Darmstadt)
GoTaq® DNA Polymerase	Promega (Mannheim)
Proteinase K	Fermentas (St.Leon-Rot)
RNase A	Qiagen (Hilden)
Taq-DNA-Polymerase	Fermentas (St.Leon-Rot)
T4 DNA Ligase	Fermentas (St.Leon-Rot)
Alkaline Phosphatase	Fermentas (St.Leon-Rot)
MungBean Exonuklease	New England Biolabs (Schwalbach)

Behandlung von Geräten und Lösungen

Alle hitzestabilen Geräte, Materialien und Lösungen wurden zur Sterilisation und Inaktivierung von Nukleasen autoklaviert. Nicht autoklavierbare Geräte wurden mit 70 % (v/v) Ethanol gereinigt. Metallische Materialien wie Pinzetten, Stempel und Impfösen wurden vor Gebrauch abgeflammt. Nicht autoklavierbare Lösungen, sowie Gase wurden sterilfiltriert.

2.5 Nährmedien und Mediumzusätze

Sofern nicht anders angegeben, wurden die Medien, sowie die dafür benötigten Lösungen, in $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ angesetzt und durch Autoklavieren bei 121 °C für 20 min sterilisiert. Zur Herstellung von festen Nährböden wurde dem Medium, mit Ausnahme des Schwärm-Agars, vor dem Autoklavieren 1,5 % (w/v) Agar-Agar zugefügt. Zur Herstellung von LB-Topagar wurde dem Medium vor dem Autoklavieren 0,8 % (w/v) Agar-Agar zugegeben. Der Zusatz von Antibiotika erfolgte nach Abkühlung der Medien auf 50-60 °C.

Luria-Bertani (LB)-Medium (Sambrook *et al.* 1989)

Trypton	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	10 g
$\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$	ad 1000 ml

SOC-Medium

Trypton	20 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	0,58 g
KCl	0,18 g
$\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$	ad 1000 ml

NB-Medium

Trypton	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	5 g
$\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$	ad 1000 ml

Abschließend wurden die Medium wie folgt komplementiert:

MgCl_2	10 mM	Glukose	2 g
MgSO_4	10 mM		
Glukose	20 mM		

Schwärm-Agar für *E. coli* (Harshey et al., 1994)

Als Basis des Schwärm-Agars diente LB-Agar mit 0,4% Eiken-Agar (Fa. Eiken, Tokyo, Japan). Als Zusätze wurden 0,4 % (w/v) Glucose und 30 μ M IPTG beigefügt.

Trypton	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	10 g
Eiken-Agar	4 g
H ₂ O _{dest.}	ad 1000 ml

Künstliches Seewassermedium (modifiziert nach Widdel, 1992)**A. 6-Vitamin-Lösung**

4-Aminobenzoat	4 mg
D-(+)-Biotin	1 mg
Nicotinsäure	10 mg
Calcium-D-(+)-panthothenat	5 mg
Pyridoxaminedihydrochlorid	15 mg
Liponsäure	1,5 mg
Folsäure	4 mg
20 mM NaP-Puffer (pH 7)	ad 100 ml

B. Thiamin (B₁)

Thiamin	10 mg
25 mM NaP-Puffer (pH 3,4)	ad 100 ml

C. Cyanocobalamin (B₁₂)

Cyanocobalamin	5 mg
H ₂ O _{dest.}	ad 100 ml

D. Riboflavin (B₂)

Riboflavin	5 mg
25 mM NaP-Puffer (pH 3,4)	ad 100 ml

E. Selenit/Wolframat

NaOH	400 mg
Na ₂ WO ₂	8 mg
Na ₂ SeO ₃	6 mg
H ₂ O _{dest.}	ad 1000 ml

F. Spurenelemente

HCl (37 %, rauchend)	12,5 ml
FeSO ₄ · 7 H ₂ O	2100 mg
H ₃ BO ₃	30 mg
I ₂ · 4 H ₂ O	100 mg
CoCl ₂ · 6 H ₂ O	190 mg
NiCl ₂ · 6 H ₂ O	24 mg
CuCl ₂ · 2 H ₂ O	2 mg
ZnSO ₄ · 7 H ₂ O	144 mg
Na ₂ MoO ₄	36 mg
MnCl ₂ · 4 H ₂ O	100 mg
H ₂ O _{dest.}	ad 1000 ml

G. Bicarbonat-Lösung

NaHCO ₃	2,52 g
H ₂ O _{dest.}	ad 30 ml

H. Stickstoff-/Phosphat-Lösung

NH ₄ Cl	0,25 g
KH ₂ PO ₄	0,2 g
H ₂ O _{dest.}	ad 50 ml

I. 1-M-Sulfid-Lösung

Na ₂ · 9 H ₂ O	24 g
H ₂ O _{dest.}	ad 100 ml

J. Benötigte Salze

KBr	0,756 mM
KCl	8,05 mM
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	10 mM
Mg ₂ Cl ₂ · 6 H ₂ O	27,89 mM
Mg ₂ SO ₄ · 7 H ₂ O	27,6 mM
NaCl	451 mM

A-D wurden steril filtriert, E-I autoklaviert. Das Medium wurde unter anaerober Atmosphäre hergestellt. Für 1 l Medium wurden folgende Mengen benötigt:

A-F und I	1 ml
G	30 ml
H	50 ml

Als Sauerstoff-Idikator wurde dem Medium Resazurin (1 mg) beigelegt. Der pH wurde auf 7,5 eingestellt.

Antibiotika und andere Medienzusätze

In Tabelle 4 sind die den Medien nach dem Autoklavieren zugesetzten Substanzen aufgeführt. Antibiotika-Stammlösungen wurden nach Sambrook *et al.*, (1989) angesetzt. Die wässrigen Stammlösungen wurden sterilfiltriert, aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

Tab. 7: Stammlösungen von Antibiotika sowie anderer Zusätze und ihre Endkonzentration im Medium

Zusatz	Lösungsmittel	Stammlösung	Endkonzentration im Medium
Ampicillin	70 % Ethanol (v/v)	100 mg/ml	100 µg/ml
Chloramphenicol	100 % Ethanol (v/v)	12,5 mg/ml	100 µl/ml
4-Hydroxy-5-methyl-3-furanone	H ₂ O _{dest.}	2 M	67 mM
IPTG	H ₂ O _{dest.}	100 mM	200 µM
Kanamycin	H ₂ O _{dest.}	30 mg/ml	30 µl/ml
N-(β-Ketocaroyl)-L-homoserine lactone	Ethylacetat	100 mM	0,5 mM
X-Gal	N,N-Dimethylformamid	40 mg/ml	40 µg/ml

2.6 Puffer und Lösungen

CB-Puffer

Tris-HCl (pH 7,4)	20 mM
NaCl	200 mM
EDTA	1 mM

Zur Elution wurde der Puffer anschließend, wie folgt komplementiert:

Maltose	10 mM
---------	-------

20 mM NaP-Puffer

Na ₂ HPO ₄	0,356 g
NaH ₂ PO ₄	0,27 g
H ₂ O _{dest.}	ad 100 ml

DNA-Extraktionspuffer (DEP)

Tris	100 mM
Sodium EDTA	100 mM
Sodium Phosphat	100 mM
NaCl	1,5 M
CTAB	5 %
pH 8,0	

50 x TAE-Puffer

Tris	242 g
Eisessig (99 % (w/v))	57 ml
EDTA (0,5 M, pH 8,0)	100 ml
H ₂ O _{dest.}	ad 1000 ml

10 x DNA-Ladepuffer

1 x TAE-Puffer	
Glycerin	50 %
Bromphenolblau	0,1 % (w/v)
Xylencyanol FF	0,1 % (w/v)

TB-Puffer

Pipes	10 mM
CaCl ₂ x 2H ₂ O	15 mM
KCl	250 mM
pH 6,7 einstellen	
Autoklavieren für 20 min bei 121 °C.	
Zugabe von sterilem	
MnCl ₂ x 4H ₂ O	55 mM

1 x TE

Tris/ HCl	10 mM
EDTA	2 mM
pH 8,0	

Kupfersulfat-Lösung

HCl (25%)	50 mM
CuSO ₄	5 mM
H ₂ O _{dest.}	ad 1000 ml

Hybridisierungspuffer

Tris-HCl (pH 7,4)	20 mM
Dextransulfat	10 % (w/v)
Formamid	35-60 % (v/v)
NaCl	900 mM
Blocking Reagenz	2 % (v/v)
Triton X-100	0,05 % (v/v)
SDS	0,02 % (v/v)
H ₂ O _{dest.}	ad 100 ml

Lysozym-Lösung

Tris-HCl (pH 7,4)	100 mM
EDTA (pH 8)	50 mM
H ₂ O _{dest.}	ad 10 ml
Lysozym (10.000 U)	10 mg/ml

Achromopeptidase-Lösung

Tris-HCl (pH 8)	10 mM
NaCl	10 mM
H ₂ O _{dest.}	ad 10 ml
Achromopeptidase (30 U/μl)	2 μl/ml

1x PBS-Puffer

NaCl	8 g
KCl	0,2 g
Na ₂ HPO ₄ *7H ₂ O	1,44 g
KH ₂ PO ₄	0,24 g
H ₂ O _{dest.}	ad 1000 ml
pH 7,3 einstellen	

2 x SSC-Puffer

NaCl	17,5 g
Na-citrate*2H ₂ O	10,03 g
H ₂ O _{dest.}	ad 1000 ml
pH 7 einstellen	

2.7 Anzucht und Zellernte

Aerobe Wachstumsbedingungen

Alle *E. coli*- Stämme, die auf LB-Agarplatten gezogen wurden, wurden bei 37 °C über Nacht inkubiert. Die Anzucht von *E. coli* in flüssigem LB-Medium erfolgte bei 37 °C in sterilen Kulturröhrchen oder Erlenmeyerkolben auf einem Rundschüttler (150 rpm, Certomat® R, B. Braun, Melsungen). Zur Herstellung von Hauptkulturen wurden diese mit 2-4 % (v/v) einer Vorkultur beimpft.

Zur Selektion von transformierten *E. coli*-Zellen wurde dem LB-Medium in Abhängigkeit der Plasmid- bzw. Fosmid-vermittelten Resistenz das entsprechende Antibiotikum zugefügt. Für die Blau-Weiß-Selektion wurde dem LB-Agar der künstliche Induktor IPTG und X-Gal als chromogene Substanz zugegeben.

Für die parallele Anzucht von 96 Klonen wurden Mikrotiterplatten (MTP, Greiner Bio-One, PS-Microplate, U-Form) mit einem Kulturvolumen von 150 µl/well oder deepwell-Platten (Sarstedt, MegaBlock 96 Well) mit einem Volumen von 1,5 ml/well genutzt. Diese wurden mit atmungsaktiven Membranen (Breathe-Easy Roth, Karlsruhe) verschlossen und bei 80 rpm und 37 °C (Gerhardt Thermoshake, Königswinter) inkubiert. Die MTP wurden ohne Schütteln bei 37 °C inkubiert.

C. violaceum CV026 wurde auf LB-Agarplatten oder in flüssigem LB-Medium in sterilen Kulturröhrchen bei 30 °C über Nacht inkubiert.

Überexpression in *E. coli* BL21 (DE 3)

Das QQ-Protein wurde in Fusion mit dem Maltosebindeprotein (MBP) vom Plasmid pRS630 in *E. coli* BL21 (DE 3) überexprimiert. Dafür wurden 10 ml einer üN-Kultur in 10 ml NB-Amp-Medium bei 37 °C und 150 rpm gezogen. Die Expression des Fusionsproteins wurde vom *tac*-Promotor durch die Zugabe von 0,3 mM IPTG bei einer $OD_{600} = 0,6$ induziert. Nach 3 h Inkubation unter den oben genannten Bedingungen erfolgte bei einer $OD_{600} = 1,2$ die Zellernte und der Zellaufschluss.

Stammhaltung

Zur Herstellung von Stammkulturen von *E. coli* wurden die Zellen in LB-Medium mit entsprechenden Zusätzen bis zur logarithmischen Wachstumsphase inkubiert, mit 30 % (v/v) Glycerin versetzt und bei -70 °C gelagert.

Anaerobe Wachstumsbedingungen für methanoxidierende Mikroorganismen aus Sedimentproben

Zur Herstellung der Sediment-Medium-Gemische wurden Sedimentproben mit anaerobisiertem künstlichem Seewassermedium versetzt und in sterilen Glasflaschen (Schott, Mainz), Serumflaschen (1:6, Schott, Mainz) oder Hungate Kulturröhrchen (1:8, Dunn, Asbach) gasdicht mittels Hungate-Technik und Butylgummistopfen verschlossen (Hungate, 1969). Der Gasraum (50 %) der Kulturfラスchen wurde nach dem Abfüllvorgang mit Methan bzw. N_2/CO_2 (Kontrollen) ausgetauscht. Die Sediment-Medium-Gemische in Glas- (1:1) und Serumflaschen (1:6) wurden liegend, bei 18 °C im Dunkeln inkubiert.

Die Sediment-Medium-Gemische in den Hungate Kulturröhrchen (1:8) wurden bei verschiedenen Temperaturen in Kühlräumen (0 °C, 4° C), im Wasserbad (16 °C, 35 °C), im Brutschrank (70 °C) oder bei RT im Dunkeln liegend inkubiert.

Bestimmung der optischen Dichte

Die Bestimmung der Zelldichte von Flüssigkulturen wurde mit Hilfe photometrischer Messungen in 1,5 ml Halbmikroküvetten aus Polystyrol (Roth, Karlsruhe) mit einer Schichtdicke von 1 cm durchgeführt. Hierzu wurde die optische Dichte (OD) einer Flüssigkeit in einem Spektralphotometer (Beckman DU 640 Spectrophotometer, Krefeld) bei einer Wellenlänge von 600 nm gemessen, unbeimpftes Medium diente als Referenzwert. Bei *E. coli* entspricht eine $OD_{600} = 0,1$ etwa einer Zellkonzentration von 1×10^8 Zellen ml^{-1} .

2.8 Extraktion von AHL-Molekülen

Zur Extraktion von AHL-Signalmolekülen aus Klonen der Metagenombank wurden zunächst alle 96 Klone einer MTP als Pool behandelt. Die duplizierten 96er-Kulturen jeder MTP wurden in einem sterilen 15 ml Falcontube vereinigt und bei 4 °C, 4.000 rpm (Eppendorf Centrifuge 5810 R) für min. 30 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein 50 ml Falcontube überführt und mit dem gleichen Volumen Ethylacetat versetzt und durch 10 x invertieren gemischt. Nach deutlicher Phasentrennung wurde die obere Phase in ein neues 50 ml Falcontube überführt und unter dem Abzug eingedampft. Die Aufnahme des Rückstandes erfolgte in 200 µl Ethylacetat.

Zur Extraktion von AHL-Signalmolekülen aus Einzelklonen wurden die MTP in deepwell-Platten in 1,5 ml LB-Cm je well dupliziert. Die Aufnahme des Rückstandes erfolgte in 100 µl Ethylacetat.

Die Extraktion von AHL-Signalmolekülen aus den Sediment-Medium-Gemischen

erfolgte nach zweimonatiger Inkubation. Hierzu wurden 60 ml Medium in einen 1000 ml Scheidetrichter vorgelegt, mit dem gleichen Volumen Ethylacetat versetzt und für 10 min durch kräftiges Schütteln gemischt. Nach deutlicher Phasentrennung wurde die untere Phase verworfen und die obere Phase in einem 250 ml Erlenmeyerrundkolben aufgefangen. Nachfolgend wurde der Extrakt im Rotationsevaporator (Rotavapor-EL, Büchi, Flawil, Schweiz) bei einer Wasserbadtemperatur von 40 °C durch Anlegen eines Vakuums eingetrocknet. Der Rückstand im Rundkolben wurde in 1 ml Ethylacetat aufgenommen und in ein Eppendorfreaktionsgefäß überführt. Anschließend wurde der Extrakt im Heizblock unter dem Abzug auf 100 µl eingeeengt.

Die Lagerung aller Proben erfolgte bis zur Verwendung bei -20 °C.

2.9 Herstellung von Überstand und Zellextrakten für den Nachweis von QQ

Für den Nachweis von QQ-Molekülen aus Überständen (SN) und Zellextrakten (ZE) wurden die Zellkulturen entsprechend ihrer Volumina abzentrifugiert und 500 µl Überstand über sterile Zentrifugenfilter mit einer Porengröße von 0,2 µm für 5 min bei 12.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der sterilfiltrierte Überstand wurde bis zur Verwendung bei 4 °C gelagert.

Für die Herstellung von Zellextrakt wurde das erhaltene Zellpellet in einem angemessenen Volumen 50 mM Tris-HCl (pH 8) resuspendiert und mit 0,1 mm und 0,5 mm Glaskügelchen (Roth, Karlsruhe) versetzt. Für den Zellaufschluss wurden die Proben mechanisch am GenoGrinder (Spex SamplePrep Geno/Grinder 2000) für 6 min bei 1.500 strokes/min aufgeschlossen. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation für 30 min bei 4500 rpm und 4 °C zur Abtrennung der Zelltrümmer. 500 µl des Zellextrakts wurden ebenfalls mittels der Zentrifugenfilter sterilfiltriert und bis zur Verwendung bei 4 °C gelagert.

2.10 DNA-Isolierung

Isolierung chromosomaler DNA

Die Isolierung der chromosomalen DNA aus den Sedimentschichten 0-1 cm und 4-5 cm erfolgte mittels direkter Lyse mit modifiziertem Protokoll nach Henne *et al.*. Für die Isolierung von chromosomaler DNA aus der Schicht 29-31 cm wurde das Protokoll wie folgt ergänzt. Nachdem die Sedimentprobe mit 1,85 ml DNA-Extraktionspuffer (DEP) versetzt wurde, folgte ein thermischer Zellaufschluss, indem die Proben im dreimaligen Wechsel je 1 min zwischen flüssigen N₂ und kochendem Wasser inkubiert wurden. Daraufhin wurden die Proben mit 0,1 mm

und 0,5 mm Glaskügelchen (Roth, Karlsruhe) versetzt und mechanisch am GenoGrinder für 6 min bei 1.500 strokes/min aufgeschlossen. Danach wurden die Proben nach Protokoll weiter behandelt. Um organische PCR-Inhibitoren wie z.B. Huminsäuren oder Fulvinsäuren zu entfernen, wurde die Probe mit dem Soil-Master™ DNA Extraction Kit nach Angaben des Herstellers (Epicentre, Oldendorf) aufgereinigt.

Isolierung von Fosmid-DNA

Zur schnellen Isolierung von Fosmiden aus einem Kultur-Volumen von 5 ml wurde eine modifizierte Form der Plasmidisolierung nach Birnbiom und Doly (Birnbiom & Doly, 1979) angewandt. Die DNA wurde zweimal mittels Ethanol und einmal durch Phenol/Chloroform (24:1) gefällt und nach dem Trocknen in 25 μl $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ resuspendiert.

Isolierung von Plasmid-DNA

Für die Isolierung wurde ein Kulturvolumen von 3 ml eingesetzt. Die Isolation erfolgte mit dem NucleoSpin® Plasmid QuickPure-Kit nach Angaben des Herstellers (Macherey-Nagel, Düren).

2.11 Gelelektrophorese

Standard-Agarose-Gelelektrophorese

Mit Hilfe der Standard-Agarose-Gelelektrophorese können DNA-Fragmente analytisch und präparativ aufgetrennt werden (Sambrook *et al.*, 1989). In horizontalen Kammern mit 10-30 ml Volumen und einer Trennstrecke von bis zu 8 cm wurde 1 % (w/v) Agarose, gelöst in 1 x TAE-Puffer, gegossen. Nach dem Aushärten des Gels konnten die mit DNA-Ladepuffer versetzten Proben aufgetragen werden. Als Elektrophoresepuffer diente 1 x TAE-Puffer. Die konstante Spannung betrug 80-100 Volt (BIO-RAD Power Pac 300, BIO-RAD, München; Electrophoresis Power Supply-EPS 200, Pharmacia Biotech, Freiburg).

Nach Abschluss der Elektrophorese wurden die Agarosegele in einem Ethidiumbromidbad ($1 \mu\text{g ml}^{-1}$) für 15-30 min gefärbt. Nach anschließender Entfärbung im Wasserbad wurden die Nukleinsäuren unter UV-Licht bei einer Wellenlänge von 254 nm sichtbar gemacht.

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die SDS-PAGE nach Lämmli (1970) findet unter denaturierenden Bedingungen statt und dient der Auftrennung von Proteinen nach der Masse. Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurden in einer Bio-Rad Elektrophorese-Apparatur (Mini Protean Tetra Cell, Bio-Rad, München) durchgeführt. Vor der Elektrophorese wurden die Proben mit 2 × SDS-Probenpuffer verdünnt und 10 min bei 95 °C im Heizblock denaturiert. Von dieser Probelösung wurden 20 µl pro Spur auf das Gel aufgetragen. Die Spannung während der 80 minütigen Gelelektrophorese betrug 180 V.

2 × SDS-Ladepuffer		10 × SDS-Laufpuffer	
Tris-HCl	1,15 g	Tris-HCl	30 g
SDS	4 g	Glycin	144 g
Mercaptoethanol	10 ml	SDS	10 g
Bromphenolblau	20 mg	H ₂ O _{dest.}	ad 1000 ml
H ₂ O _{dest.}	ad 100 ml		

Zusammensetzung der SDS-Polyacrylamidgele (die Angaben beziehen sich auf die Herstellung von einem Gel):

Trenngel (8 %ig)	
0,27 % SDS in 1M Tris-HCl (pH = 8,8)	1,2 ml
H ₂ O _{dest.}	2,63 ml
Acryamid/Bisacrylamid (29:1)	960 µl
TEMED (Roth)	6 µl
APS 10 % (w/v)	30 µl

Sammegel (5 %ig)	
1,2 % SDS in 1M Tris-HCl (pH = 8,8)	460 µl
H ₂ O _{dest.}	1,1 ml
Acryamid/Bisacrylamid (29:1)	230 µl
TEMED (Roth)	2 µl
APS 10 % (w/v)	11 µl

Coomassiefärbung von Polyacrylamidgelen

Zur unspezifischen Proteinfärbung mit "Coomassie Brilliant Blue" wurden die Polyacrylamidgele in der Färbelösung für 1 min in der Mikrowelle aufgekocht und anschließend für 5 - 10 min in der Färbelösung geschwenkt. Die Gele wurden danach kurz mit H₂O_{dest.} gespült und dann in H₂O_{dest.} wiederum in der Mikrowelle aufgekocht, bis der Hintergrund beinahe vollständig entfärbt war. Zur Doku-

mentation konnten die Gele sofort nass am Computer, mit Hilfe eines Flachbett-Scanners, aufgenommen werden.

Färbelösung für Gele

Ethanol	2,5 %
Eisessig	10 %
Phast Gel Blue	2 Tabletten/1000 ml

2.12 Standardtechniken zum Arbeiten mit Nukleinsäuren

Bestimmung von Nukleinsäurekonzentrationen

Die Konzentrationsbestimmung von DNA erfolgte photometrisch am NanoDrop (Peqlab, Erlangen). Die Extinktion der Probe wurde bei 260 nm gemessen, wobei zur Abschätzung der DNA-Konzentration folgende Richtwerte gelten (Davis *et al.*, 1980):

$OD_{260nm} = 1,0 \longrightarrow 50 \mu\text{g ml}^{-1}$ (bei doppelsträngiger DNA)

Enzymatische Modifikation von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Das sequenzspezifische Schneiden von DNA mit Restriktionsendonukleasen erfolgte in Kombination mit den vom Hersteller als 10-fache Stammlösungen mitgelieferten Puffersystemen. Es wurde 1 μg DNA in einem Gesamtvolumen von 10 μl , 20 μl oder 100 μl bei 37 °C für 2 h hydrolysiert.

Restriktionshydrolysen von Vektoren wurde Alkaline Phosphatase (1 U) beige-setzt. Der Reaktionsansatz wurde für 2 h bei 37 °C inkubiert, gefolgt von einer 15 min Inkubation bei 65 °C zur Inaktivierung der Alkalinen Phosphatase.

Isolierung der DNA-Fragmente aus Agarosegelen

Die Gelaufreinigung der benötigten Banden wurde durch das NucleoSpin Extract II Kit (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die DNA wurde in 20 μl mitgeliefertem Elutionspuffer gelöst.

Aufreinigung von Reaktionsansätzen

Die Aufreinigung von PCR-Produkten und Restriktionshydrolysen erfolgte durch das NucleoSpin® Extract II-Kit (Macherey-Nagel, Düren) nach Angaben des Her-

stellers.

Degradierung von DNA-Einzelsträngen mit Mung Bean Nuklease

Für den den Abbau einzelsträngiger DNA-Moleküle wurden 5 µg dsDNA mit 25 U Mung Bean Nuklease und 10x Reaktionspuffer versetzt (1x in der Endkonzentration) und 30 min bei 37 °C inkubiert.

2.13 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Zur Amplifikation der 16S rDNA wurde eine Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) unter Verwendung bakterieller/archaeeller 16S-Primer-Paare (je 100 µM) angewendet. Für die Sedimentschichten 0-1 cm und 4-5 cm wurde die Taq-DNA-Polymerase (Fermentas, St.Leon-Rot), für die Schicht 29-31 cm die GoTaq® DNA Polymerase (Promega, Mannheim) benutzt. Als Template dienten 2-10 ng chromosomale DNA. Zu dem 25 µl Ansatz wurden weiterhin 1,25 mM eines dNTP-Mixes, 2,5 µl 10 × Puffer und 1 µl BSA (Bovine Serum Albumin) zugefügt.

Das Standard-PCR-Programm bestand aus folgenden Schritten:

96 °C	5 min	} 30 Zyklen
94 °C	30 sec	
50 °C	45 sec	
72 °C	1,5 min	
72 °C	10 min	

Die Temperaturzyklen wurden mit einem Eppendorf Master cycler personal (Eppendorf, Hamburg) oder einem Minicycler™ (MJ Research, USA) durchgeführt.

Die Amplifikation von inserierten DNA-Fragmenten erfolgte nach dem gleichen Programm, aber mit vektorspezifischen Primern, welche die multiple Klonierungsstelle einrahmen.

Die Amplifikation des möglichen QQ-ORFs durch PCR, erfolgte mit ORF-flankierenden Primern in einem Gesamtvolumen von 50 µl. Das Standard-PCR-Programm wurde entsprechend der verwendeten Primer und der Länge des zu amplifizierenden DNA-Fragments modifiziert.

2.14 Ligation

Ligation von DNA-Fragmenten in pCR[®]II-TOPO[®]

Die amplifizierten PCR-Produkte wurden in den TOPO-TA-Cloning-Vektor pCR[®]II TOPO[®] durch die am Vektor kovalent gebundene Topoisomerase I und die vorhandenen T-Überhänge kloniert. Die Berechnung der einzusetzenden DNA-Menge für die Ligation, mit einem Verhältnis von Insert zu Vektor von 3:1, beruhte auf der Annahme, dass 1 µg eines 1 kb-Fragments 1,53 pmol Teilchen enthält. Die Ligationsreaktion erfolgte nach Herstellerangaben (Invitrogen, Karlsruhe).

Ligation von DNA-Fragmente in pDrive/ pMAL[™]-c2X

Die Ligation von DNA-Fragmenten in pDrive/ pMAL[™]-c2X wurde in einem Volumen von 20 µl mit jeweils 30 bis 50 ng Vektor- und Insert-DNA (1:1) durchgeführt. Zum Reaktionsansatz wurden 0,1 Volumen eines zehnfach konzentrierten ATP-haltigen Ligationspuffer und 1 U T4-DNA-Ligase zugegeben und üN bei 16 °C inkubiert.

2.15 Transformation von DNA in *E. coli*

Herstellung chemisch kompetenter Zellen

250 ml SOB-Medium mit 1 mM MgCl₂ und 1 mM MgSO₄ wurden mit 250 µl einer 5 ml ÜN-Kultur (37 °C, 150 rpm) beimpft und bei 18 °C im Wasserbad unter Schütteln (120 rpm) bis zu einer OD₆₀₀ = 0,6 – 1,0 angezogen. Es folgte eine Inkubation für 10 min auf Eis und anschließend ein Zentrifugationsschritt bei 5.500 rpm für 10 min bei 4 °C. Das Zellpellet wurde in 80 ml kaltem TB-Puffer gewaschen. Dieser Schritt wurde wiederholt und das Zellpellet wurde anschließend in 10 ml TB-Puffer resuspendiert wobei unter leichtem Schwenken 700 µl DMSO hinzugefügt wurde. Die Zellen wurden in 200 µl Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -70 °C.

Hitzeschock-Methode

200 µl chemisch kompetente *E. coli* DH5α-Zellen wurden zunächst auf Eis aufgetaut, mit 2 µl Ligationsansatz bzw. Fosmiden versetzt und mind. 30 min auf Eis inkubiert. Darauf folgte der Hitzeschock bei 42 °C für 90 Sekunden (Permeabilisierung der Membran), die Zugabe von 1 ml eiskaltem SOC-Medium und eine erneute Inkubation für mind. 2 min auf Eis. Zur Resistenzausprägung wurde eine weitere Inkubation für eine Stunde bei 37 °C durchgeführt. Für die Selektion der rekombinanten Klone wurde der Transformationsansatz auf LB-Platten mit den entsprechenden Antibiotika und Zusätzen ausplattiert.

Elektroporation

50 µl der elektrokompetenten Zellen des *E. coli*-Stammes BL21 (DE 3) wurden zunächst auf Eis aufgetaut. Die Zellen wurden mit 2 µl des Ligationsansatzes versetzt und in vorgekühlte Elektroporations-Küvetten mit einer Spaltbreite von 2 mm luftblasenfrei überführt. Die Elektroporation erfolgte unter folgenden Bedingungen: 200 Ω, 25 µF, 2,5 kV. Die Zeitkonstante für *E. coli* betrug 4-5 ms. Danach wurden 950 µl SOC-Medium auf den Ansatz gegeben und es folgte eine Inkubation für 1 h bei 37 °C und 200 rpm für die Ausprägung der durch pMALTM-c2X vermittelten Ampicillinresistenz. Die Ansätze wurden zur Selektion auf LB-Amp-Platten ausplattiert.

2.16 DNA-Sequenzierung und Analyse

Die Sequenzierreaktionen wurden am Institut für Klinische Molekularbiologie (Uniklinikum SH) am ABI 3730xl DNA Analyzer durchgeführt. Die Fluoreszenzsignale wurden automatisch in Sequenzdaten umgewandelt, die in dem Programm Chromas (Technelysium Pty Ltd, Queensland) angezeigt werden konnten. Die 16S rDNA-Sequenzen wurden mit der Software BioEdit (Ibis Therapeutics, USA) editiert. Die Auswertung der Sequenzdaten erfolgte mit Hilfe des Programmpakets ARB (Strunk *et al.*, 1998), das eine erweiterbare Datenbank mit ca. 446.000 16S rDNA-Sequenzen (MPI Bremen, Jan 2010) zur Verfügung stellt. Die folgenden Programme wurden für die Ableitung von Pimern, die Assemblierung der Sequenzen und die Analyse von putativen ORFs verwendet.

- *CodonCodeAligner* <http://www.codoncode.com/aligner/>
- *orf finder* <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>
- *web map preferences* http://pga.mgh.harvard.edu/web_apps/web_map/start

- *OligoExplorer* <http://www.genelink.com/tools/gl-oe.asp>
- *Clone Manager Suite* (Sci Ed Software, Durham, USA)

Die Chromatogramme der erhaltenen Sequenzen wurden im *CodonCodeAligner* geladen und die Sequenzen editiert. Die assemblierten Sequenzen wurden hier als *Contig* dargestellt. Die Sequenz der gefundenen Contigs wurde daraufhin parallel in das Programm *orf finder* und *web map preferences* eingespeist. Die angezeigten putativen ORFs wurden mit der NCBI-Proteindatenbank (blastp) abgeglichen, um den möglichen QQ-ORF zu identifizieren.

Zur vollständigen Sequenzierung des Inserts und zur Amplifikation des QQ-ORFs wurden Oligonukleotide, mit Hilfe des Programms *OligoExplorer*, im Hinblick auf die Ausbildung von Sekundärstrukturen, sowie auf geeignete Hybridisierungstemperaturen abgeleitet.

Schnittstellen für Restriktionsenzyme innerhalb putativer QQ-ORFs konnten mit Hilfe der *Clone Manager Suite* aufgespürt werden und so geeignete Schnittstellensequenzen zur Konstruktion der Primer gefunden werden.

Konstruktion einer Metagenombank

Die Konstruktion der Metagenombank erfolgte mit dem CopyControl™ Fosmid Library Production Kit (Epicentre, Oldendorf) nach modifizierten Herstellerangaben (mündliche Übermittlung von N. Pinnow). Die Fragmente der genomischen DNA wurden in das Fosmid pCC1FOS™ kloniert und mittels λ -Phagenpartikel in *E. coli* EPI 300™-T1R transduziert.

2.17 Screening auf QS- und QQ-Aktivität

Screening-Platten

Zum Nachweis von AHLs mit den Stämmen *C. violaceum* CV026 und *E. coli* DH5 α /pRS354 wurden LB-Agarplatten mit jeweils 3 ml LB-Topagar und 25 % \bar{u} N-Kultur des jeweiligen Stamms überschichtet. Die *E. coli* DH5 α /pRS354-Indikatorplatten wurden aus LB-Amp-Agarplatten hergestellt.

Zum Nachweis der QQ-Aktivität wurden LB-Amp-Agarplatten verwendet, die mit 3 ml Top-Agar überschichtet wurden. Dem Top-Agar wurde Ampicillin, Kanamycin, 10 % des jeweiligen Reporterstamms *E. coli* DH5 α /pRS354 oder *E. coli* DH5 α /pRS356 und 100 mM N-(β -Ketocaproyl)-L-homoserine-lactone bzw. 2 M 4-Hydroxy-5-methyl-3-furanone zugefügt.

AHL-Screening

Von den AHL-Extrakten wurden jeweils 20 µl auf Rotilabo®-Testblättchen pipettiert damit das Ethylacetat verdampfen kann. Anschliessend wurden die Testplättchen mit den AHL-Extrakten auf die Indikatorplatten gegeben. Als Positivkontrolle wurden synthetische AHL-Moleküle, gelöst in Ethylacetat eingesetzt. Als Negativkontrolle diente reines Ethylacetat.

QQ-Screening

Die Klone der Fosmid-Banken wurden zunächst auf QQ-Aktivität untersucht, indem alle 96 Klone einer MTP als Pool behandelt wurden. Jeweils 5 µl der Überstände und Zellextrakte aus den 96er-Pools einer jeden MTP wurden für das Screening auf QQ-Aktivität auf die vorbereiteten Screening-Platten pipettiert.

Die als positiv bewerteten 96er-Pools wurden anschließend im 96er-Plattenformat gescreent. Hierzu wurden positive SN-Pools erneut in MTP dupliziert. Die Überstände der einzelnen 96 putativ positiven Klone konnten mittels 48er-Metallstempel (Eigenbau, Kiel) direkt auf die vorbereiteten Screening-Platten übertragen werden.

Putativ positive Einzel- und Subklone wurden in 2 ml Eppendorfgefäßen (Löcher im Deckel) angezogen und 5 µl der Überstände auf die vorbereiteten Screening-Platten pipettiert.

5 µl des aufgereinigten MBP-Fusionsproteins QQ 1 und Proteinverdünnungen (1:10, 1:100, 1:500, 1:1000) wurden auf die vorbereiteten Screening-Platten pipettiert.

2.18 Proteinaufreinigung mittels Affinitätschromatographie

Die Zellernte der Kultur erfolgte bei einer $OD_{600} = 1,2$. Die Flüssigkultur wurde mit einem JA10-Rotor in einer Avanti J-26 XP-Zentrifuge (Beckman Coulter, USA) bei 4 °C und 9500 rpm für 30 min zentrifugiert. Die Zellpellets wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert. Zur Herstellung von Gesamtzellextrakten wurden die Zellen in 10 ml kaltem CB-Puffer resuspendiert. Es folgte ein Zellaufschluss in einer Frenchpress (SLM Instruments Company, Urbana, USA) bei einem Druck von 600 psi. Der so gewonnene Rohextrakt wurde für 30 min im JA 25.50 Rotor der Avanti-Zentrifuge bei 13.000 rpm zentrifugiert. Der aus dem Überstand gewonnene Zellextrakt wurde über einen Glasfaser Rundfilter und anschließend über einen 0,45 µm porigen Polycarbonat-Sterilfilter filtriert. Für die Aufreinigung des MBP-Fusionsproteins QQ 1 wurde eine Amylose-Resinmatrix (New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main) verwendet. Eine 5 ml

Chromatographiesäule (Bio-Rad, München) mit eingebetteter Matrix (1 ml), wurde mit einem Säulenvolumen $H_2O_{\text{dest.}}$ gewaschen und mit zwei Säulenvolumen CB-Puffer equilibriert. Zu dem filtrierten Rohextrakt wurde Amylose Resin gegeben und bei 4 °C auf dem 3D-Schüttler (Polymax 1040, Heidolph, Schwabach) für 30 min inkubiert. Der gesamte Rohextrakt wurde auf die Säule gegeben und 2 ml des Durchflusses in einem Reaktionsgefäß aufgefangen. Anschliessend wurde mit einem Säulenvolumen CB-Puffer gewaschen und in 3 RG aufgenommen. Die Elution erfolgte mit 10 mM Maltose in 4 ml CB-Puffer. Die Eluate wurden, auf 10 RG aufgeteilt, aufgenommen. Zur Regeneration der Amylosematrix wurde diese mit zwei Volumen CB-Puffer gewaschen und in Ethanol gelagert. Die Eluate mit dem aufgereinigten Protein wurden vereinigt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und zur weiteren Verwendung bei -70 °C gelagert.

2.19 CARD-FISH (Catalyzed Reporter Deposition Fluorescence *in situ* hybridization)

Fixierung von Sedimentproben

Die Fixierung erfolgte direkt nach Probennahme auf dem Schiff. 1 Vol. Probe wurde mit 3 Vol. 4 % (v/v) Formaldehyd vermischt und 2-4 h bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde das Probengemisch bei 10.000 x g für 1 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Zweimal wurde die fixierte Probe mit 1 ml 1x PBS gewaschen und zur Endfixierung in einem geeigneten Volumen 1:1 Gemisch (v/v) aus 96 % Ethanol und 1x PBS resuspendiert. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C.

Filtration fixierter Zellen auf Polycarbonatfilter

Fixierte Sedimentproben wurden 1:10 mit einem 1:1 Gemisch (v/v) aus 96 % Ethanol und 1x PBS verdünnt und auf Eis gekühlt für 20 s einer schwachen Ultraschallbehandlung (1 Puls/s, 20% Intensität) mit einer Ultraschallsonde (Sonopuls HD70, Bandelin, Berlin) unterzogen.

Anschließend wurden Verdünnungen zwischen 1:300 und 1:500 der vorbehandelten Sedimentproben mit 1x PBS hergestellt und 1 ml davon in 9 ml 1x PBS aufgenommen. Ein Zellulosenitrat-Stützfilter wurde auf die Glasfritte aufgelegt, darauf wurde einen Polycarbonatfilter mit der glänzenden Seite nach oben positioniert. Die Probe wurde in den befestigten Filterturm geladen und unter leichtem Vakuum auf den Polycarbonatfilter gesaugt. Der Polycarbonatfilter wurde luftgetrocknet und bei -20°C gelagert.

Einbettung der Filter in Agarose

Zur Befestigung der Sedimentprobe wurden die Filter mit Hilfe eines Dispensers in 0,2 %iger (w/v), handwarmer Agarose mit niedrigem Gelierpunkt eingebettet und bei 37 °C getrocknet.

Inaktivierung von endogenen Peroxidasen

In anoxischen Sedimenten kommen Mikroorganismen mit endogenen Peroxidasen oder Proteinen mit Pseudo-Peroxidase-Aktivität vor. Da Zellen mit Peroxidase-Aktivität zu fehlerhaften Hybridisierungssignalen führen, wurden diese Enzyme, durch eine Methanolbehandlung mit 0,15 % H_2O_2 (v/v) für 30 min bei RT inaktiviert. Danach wurden die Filter mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ gewaschen und luftgetrocknet.

Permeabilisierung von Zellwänden

Die Permeabilisierung der Zellwände ist essentiell für das Gelingen der Hybridisierung. Durch die vielfältigen Beschaffenheiten mikrobieller Zellwände, variieren die optimalen Permeabilisierungsbedingungen in Abhängigkeit vom Zielorganismus. Die Permeabilisierungsschritte für die verwendeten Oligonukleotidsonden sind im Anhang aufgeführt. Anschließend wurden die Filter mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ gewaschen und luftgetrocknet.

Hybridisierung

Aus den lyophilisierten Biotin-markierten Sonden wurden Stammlösungen und daraus Verdünnungen der Konzentration $50 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$ hergestellt.

Die Filterteile wurden mit einem 400 μl Hybridisierungspuffer-Sondengemisch (300:1) beschichtet. Die Formamidkonzentrationen der jeweiligen Hybridisierungspuffer für die verwendeten Sonden sind dem Anhang zu entnehmen.

Die Hybridisierung erfolgte im Hybridisierungsofen bei 46 °C für 2 Stunden. Nicht gebundene Sondenmoleküle wurden nachfolgend durch 2x SSC Puffer ausgewaschen. Zur Vermeidung unspezifischer Bindungen folgte ein 30 min (RT) Inkubationsschritt mit 100 μl Blockingreagenz in PBS.

HRP-Markierung & Tyramid-Signalamplifikation

Die Bindung von streptavidin-HRP an die Biotin-markierte Sonden und die anschließende Tyramid-Signalamplifikation wurden mit Hilfe des TSA™ Kit #22 *with HRP—streptavidin and Alexa Fluor® 488 tyramide* (Invitrogen, Karlsruhe), bzw. mit TSA™ Kit #23 *with HRP—streptavidin and Alexa Fluor® 546 tyramide* nach Herstellerangaben durchgeführt.

Doppelhybridisierung

Für die Doppelhybridisierung musste die gebundene HRP aus dem ersten Hybridisierungsschritt durch eine Methanolbehandlung mit 0,5 % H₂O₂ (v/v) für 30 min bei RT inaktiviert werden. Danach wurden die Filter mit H₂O_{dest.} gewaschen und luftgetrocknet. Es folgte der zweite Hybridisierungsschritt mit einer anderen Biotin-markierten Sonde und anschließend die HRP-Markierung und Tyramid-Signalamplifikation.

Kombination von CARD-FISH und DAPI-Färbung

Um den relativen Anteil hybridisierter Zellen bestimmen zu können, wurde nach der Hybridisierung eine Färbung aller Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI (4',6'-Diamino-2-phenylindol) durchgeführt. Die Färbung der Proben erfolgte durch Überschichtung mit ca. 10 µl DAPI-Lösung (1 µg µl⁻¹) und Inkubation für ca. 10 min. Die Proben auf den Objektträgern bzw. Filterstücken wurden darauf kurz mit Milli-Q Wasser gewaschen und in 80 % Ethanol fixiert. Nach Trocknung an der Luft erfolgte die Einbettung der Proben mit einem Citifluor/Vectashield-Gemisch (4:1). Die präparierten Objektträger wurden bis zur mikroskopischen Auswertung bei -20 °C gelagert.

Detektion und Dokumentation der Hybridisierungsergebnisse

Die präparierten Objektträger wurden mit einem Epifluoreszenzmikroskop der Fa. Leitz ausgewertet (Leitz Aristoplan, Leica DM/RE, Olympus). Die Auflichteinrichtung des Mikroskops war mit einer 100 W Quecksilberhochdrucklampe ausgestattet. Zur Dokumentation der Ergebnisse bestand die Möglichkeit, digitale Aufnahmen mit einer verbundenen Kamera (Leica DFC 420) und der Bildverarbeitungssoftware des Herstellers (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany) zu machen. Verschiedene Filtersätze standen zur Anregung der Fluoreszenzfarbstoffe zur Verfügung:

Tab. 8: Für die Epifluoreszenzmikroskopie verwendete Filtersätze

Filtersatz	Anregungsfilter [nm]	Farbteiler [nm]	Emissionsfilter [nm]	Anwendung
L5	BP 480/40	505	BP 527/30	Alexa 488
Y3	BP 545/30	565	BP 610/75	Alexa 546
A	BP 340-380	400	LP 425	DAPI

2.20 Gaschromatographie (GC)

Zur Messung der Methankonzentration wurden aus der Gasphase der Ansätze Gasproben (100 µl) entnommen und in das Septum des Gaschromatographen (HP 5890 series II, Hewlett-Packard, Waldbronn), ausgestattet mit einer 6 FT Poropak Q (19001A - Q00) - Säule und einem Flamenionendetektor (FID) injiziert.

Injektor	150 °C
Säule	50 °C
Detektor	200 °C
Trägergas	Helium (UN1046, verdichtet; 30 ml/min)
Brenngase	H ₂ (H ₂ -Generator PG H2 100; Schmidlin - DBS AG; 30 ml/min) synthetische Luft (5,0; KW-frei; 20,5% O ₂ in N ₂ ; 300 ml/min)

Die Identifizierung erfolgte über die Retentionszeit. Die Kalibrierung der Messung erfolgte durch Injektion eines externen Standards 100 ppm (Scotty analyzed gases; Sulpelco; analytische Genauigkeit: 2 %), bzw. 1000 ppm (Air Products, Hattingen)

2.21 Photometrie

Die Sulfidmessung, aus der Reduktion von Sulfat wurde photometrisch nach der Cord-Ruwisch-Methode (Cord-Ruwisch, 1985) bestimmt. Die Methode beruht auf der Bildung und Präzipitation von löslichem Kupfersulfid, welche eine Absorption im sichtbaren Licht besitzt. Nachdem sich das Sediment in den Ansätzen abgesetzt hatte, wurden 100 µl aus dem Überstand mit einer Kupfersulfatlösung versetzt und dann bei einer Wellenlänge von 480 nm die Absorption im Photometer (UV - mini - 1240 UV - VIS Spectrophotometer Shimadzu) gemessen. Anhand einer Kalibrationskurve (0-20 mM Sulfid in anoxischem H₂O) konnten die Sulfidkonzentrationen in den Ansätzen ermittelt werden.

2.22 Radiotracer-Inkubationen

Nach viermonatiger Inkubation wurden die ermittelten Prozessraten durch Messungen mit radioaktiv markierten Substanzen überprüft. Dabei wurden die Prozesse AOM und SR in getrennten Proben gemessen. Die Ansätze wurden, versetzt mit anoxischem, künstlichem Seewassermedium im Verhältnis 1:1, in Hungate Kulturröhrchen überführt und gasblasenfrei verschlossen. Für die Messung der SRR wurden der Hälfte der Hungate Kulturröhrchen eine mit radioaktivem ³⁵S markierte Sulfatlösung (~ 500 kBq) injiziert. Für die Messung der AOM-Rate wurde der anderen Hälfte der Kulturröhrchen eine mit radioaktivem ¹⁴C markierte Methanlösung (~ 12 kBq) injiziert. Nach intensivem Schütteln wurden die Ansätze, im Dunkeln liegend, bei RT inkubiert. Nach 23 h wurde das Experiment durch Zugabe von ZnAc (SR) bzw. NaOH (AOM) gestoppt. Die SR-Ansätze wurden in 50 ml Plastikzentrifugenröhrchen transferiert, welche mit 20 ml Zinkacetat (20 % (w/w)) befüllt waren. Die AOM-Ansätze wurden in Glasgefäße (Wheaton, 44 ml) mit vorgelegter Natronlauge (NaOH, 20 ml, 2,5 % (w/w)) überführt und sofort mit Butylstopfen verschlossen. Bis zur Messung der Raten wurden die Proben bei RT gelagert.

Sulfatreduktion (SR)

Kalte Chromdistillation

Die Proben wurden in Rundkolben überführt und unter Zugabe von DMF (je 20 ml) aufgeschlossen. Unter anaeroben Bedingungen (Begasung mit N₂) wurden die Proben mit HCL (6 N, 8 ml) und anschliessend mit CrCl₂ (1 M, 16 ml) versetzt. Über impermeable nichtreaktive Tygon-Schläuche wurde die Gasphase über 2 h lang mit einer Rate von ca. 5 Blasen s⁻¹) in zwei aufeinander folgende Fallen geleitet: die erste Falle (Citrat, 0,1 M) diente der Filterung von Aerosolen, die zweite Falle (ZnAC, 5 % (w/v)) konzentrierte die durch Distillation entstandenen Sulfide als Zinksulfide an. Durch die Zugabe des Scintillationcocktails (10 ml, Ultima Gold XR, Packard) wurde die Aktivität der Zinksulfide durch Scintillationzählung quantifiziert (TRI - CARB 2100 TR Liquid Scintillation Analyser, Packard A Canberra Company).

Die Sulfatreduktionsraten wurden nach der Formel von Ingvorsen (1995) berechnet:

$$SRR = \frac{[SO_4] \cdot \Phi \cdot {}^{35}\text{TRIS} \cdot 1.06}{t \cdot {}^{35}\text{TOT}} \quad (6)$$

Die Aktivitäten werden in cpm (counts per minute) gemessen.

SRR = Sulfatreduktionsrate [$\mu\text{mol cm}^{-3} \text{Tag}^{-1}$]

[SO₄] = Sulfatkonzentration in mol l⁻¹

Φ = Porosität des Sediments

t = Die Inkubationsdauer in Tagen

³⁵TRIS = Aktivität des reduzierten ³⁵S-Schwefels

³⁵TOT = Aktivität des reduzierten ³⁵S-Schwefels + Aktivität des am Sulfat verbliebenen ³⁵S-Schwefels

1,06 = Korrekturfaktor für die erwartete Isotopenfraktionierung

Anaerobe Oxidation von Methan (AOM)

Die AOM-Raten wurden nach Treude *et al.* (2005) aus dem Gesamtmethangehalt (CH₄), der Aktivität des radioaktiven Methans (¹⁴CH₄) und der Aktivität des produzierten Kohlendioxids ¹⁴CO₂ bestimmt. Die AOM-Raten wurden nach folgender Gleichung berechnet:

$$AOM = \frac{{}^{14}\text{CO}_2 \cdot \text{CH}_4}{{}^{14}\text{CH}_4 \cdot t} \quad (5)$$

Messung von CH₄

Zuerst wurde die Gesamtkonzentration von Methan in den AOM-Proben gemessen. Dazu wurden 100 µl aus der Gasphase jeder Probe entnommen und durch Injektion in den Gaschromatographen die totale Methankonzentration bestimmt.

Messung von ¹⁴CH₄

Zur Messung des ¹⁴CH₄-Gehalts in den AOM-Proben wurde die leicht modifizierte Methode nach Iversen & Blackburn (1981) verwendet. Die gesamte Gasphase jeder Probe wurde mit synthetischer Luft (5,0 KW-frei; 20,5 % O₂ in N₂) in einer langsamen Fließgeschwindigkeit (25 ml min⁻¹) durch beheizte, mit Cu(II)-Oxid befüllte Quarzröhren (850 °C; 21100 Tube Furnance BI Barnsted Thermolyne) geleitet. In den Röhren wurde ¹⁴CH₄ zu ¹⁴CO₂ oxidiert, welches in 2 hintereinander geschalteten Scintivials (20 ml) aufgefangen wurde. Die Scintivials waren befüllt mit 10 ml Phenylethylamin/ Ethylenglycolmonomethylether (1:8). Nach der Zugabe des gleichen Volumens Scintillationscocktail (Ultima Gold XR, Packard) wurde die Aktivität durch Scintillationszählung quantifiziert (TRI - CARB 2100 TR Liquid Scintillation Analyser, Packard A Canberra Company).

Messung von ¹⁴CO₂

Um den Anteil des mikrobiell produzierten ¹⁴CO₂ zu messen, wurde die modifizierte Schüttelmethode nach Joye *et al.* (2004) angewandt. Dazu wurden die Sedimentproben zunächst gewogen und anschließend in einen 250 ml Erlenmeyerkolben überführt. Um Rückstände zu vermeiden, wurden die Glasgefäße je zweimal mit 1 ml 2,5 %igem NaOH (w/w) gespült. Über eine mit einem Butylstopfen verbundene Drahtkonstruktion wurde ein, mit 2 ml Phenylethylamin/ NaOH (1:1) befülltes Scintivial so in dem Glas platziert, dass der Austausch mit der Flüssigphase nicht möglich war. Danach wurde die Probe mit 6 ml 6M HCL versetzt, mit einem Gummistopfen und einer Metallklammer verschlossen und durch Schütteln vermischt. Die Erlenmeyerkolben wurden 4 h bei RT schüttelnd inkubiert (100 U min⁻¹, KS - 501 digital IKA-Weihe)

Anschließend wurde der Inhalt der Scintivials mit je 3 ml Scintillationscocktail versetzt und die Aktivität im Scinticounter (TRI - CARB 2100 TR Liquid Scintillation Analyser, Packard A Canberra Company) bestimmt.

3. ERGEBNISSE

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die mikrobielle Gemeinschaft aus methanreichen Sedimenten des Kraterzentrums von North Alex MV zu charakterisieren. Dabei lag der Fokus auf dem Prozess der anaeroben Oxidation von Methan (AOM), gekoppelt an die Reduktion von Sulfat und den beteiligten Mikroorganismen.

Um den Kontrollmechanismus der Methanemission in Sedimenten des North Alex Schlammvulkans besser zu verstehen, wurden im ersten Teil dieser Arbeit mikrobielle AOM- und Sulfatreduktionsraten (SRR) in *in vitro* Experimenten des North Alex Schlammvulkans bestimmt und die Temperaturabhängigkeit des Prozesses untersucht. Radiotracer Inkubationen mit ^{14}C -markiertem Methan und ^{35}S -markiertem Sulfat dienten der Verifizierung der gemessenen Raten.

Im zweiten Teil wurde ein vertikales Profil der Diversität mikrobieller Lebensgemeinschaften in Sedimenten des Kraterzentrums mittels 16S rDNA-Analyse erstellt. Durch den Einsatz von CARD FISH konnte die Zusammensetzung der mikrobiellen Lebensgemeinschaft in Abhängigkeit von der Sedimenttiefe visualisiert und quantifiziert werden.

Im dritten Teil sollten Faktoren untersucht werden, die Einfluss auf die AOM-katalysierenden Konsortien in den Sedimenten haben. Dazu wurde eine bereits angelegte Metagenombank des Habitats auf QS-Aktivität und auf Interferenz gegenüber dem intraspeziesspezifischen Signalmolekül AHL und dem interspeziesspezifischen Signalmolekül AI-2 durchmustert.

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Teilprojekte dargestellt.

3.1 Temperaturoptimum der methan-abhängigen Sulfatreduktion

In Inkubationsexperimenten sollte der Einfluss von Temperatur auf die Sulfatreduktionsraten mit Methan als Elektronendonator untersucht werden, um im Rückschluss den eng begrenzten Bereich der höchsten AOM-Aktivität zu ermitteln.

Die Rate der anaeroben Oxidation von Methan zeigte eine deutliche Abhängigkeit von der Temperatur. Die Sedimentproben zeigten ein mesophiles Temperaturprofil mit den höchsten methan-abhängigen Sulfat-Reduktionsraten zwischen 16 und 23 °C. Bei höheren und niedrigeren Temperaturen sank die Aktivität. Das Temperaturoptimum der AOM wurde bei 23 °C erreicht, mit einem Aktivitätsmaximum von $\sim 200 \text{ nmol cm}^{-3} \text{ Tag}^{-1}$. Die höchste Einzelrate wurde jedoch bei 16 °C gemessen und zeigt eine mehr als dreimal so hohe Intensität wie die beiden anderen Replikate bei dieser Temperatur (siehe Abb. 7).

Die Kontrollen (ohne Methan) zeigten bei 0 °C und 23 °C deutlich niedrigere Raten als die Ansätze mit Methan.

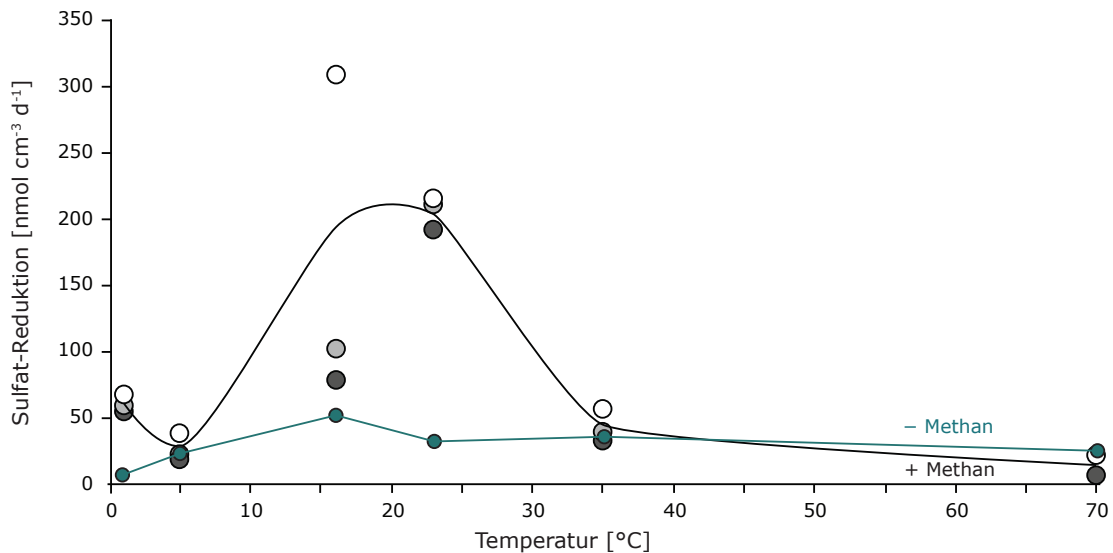


Abb. 7: Temperaturoptimum der Methan abhängigen Sulfat-Reduktion

Die Proben (3 Replikate) stammen aus einem Sedimentkern (MUC 10; 2-5 cm Tiefe) vom Zentrum des North Alex MV und wurden unter anoxischen Bedingungen mit künstlichem Seewassermedium (im Verhältnis 1:8) und Methanheadspace in Hungate Kulturröhrchen angesetzt. Der Gasraum der Kontrolle (●) bestand aus N_2/CO_2 . Die Inkubation erfolgte liegend bei verschiedenen Temperaturen in einem Zeitraum von 138 Tagen. In den Sediment-Medium-Gemischen wurde die Produktion von Sulfid ($nmol\ cm^{-3}\ d^{-1}$) aus Sulfat mit Methan als Elektronendonator photometrisch bestimmt. Die Trendlinie wurde per Hand eingefügt.

3.2 AOM:SR Stöchiometrie

In Inkubationsansätzen mit Sedimenten des Kerns MUC 10 sollte durch die direkte Messung des Methanverbrauchs und der Bildung von Sulfid aus der Reduktion von Sulfat bestimmt werden, ob beide Prozesse in einem molaren Verhältnis von 1:1 erfolgen.

Während der Inkubation von über vier Monaten konnte jedoch in den *in vitro* Inkubationsansätzen keine Sulfidbildung, als Produkt der von Methan abhängigen Sulfat-Reduktion, nachgewiesen werden. Die photometrisch gemessenen Sulfidkonzentrationen der 3 Replikate verzeichneten in dem Zeitraum sogar einen minimalen Rückgang von durchschnittlich $1\ mmol\ l^{-1}$ (Daten nicht dargestellt). Unabhängig von einem Zusatz von Methan zeigte die Kontrolle eine Sulfidabnahme in der gleichen Größenordnung.

Die Methankonzentrationen der *in vitro* Inkubationsansätze zeigten starke Schwankungen innerhalb des gemessenen Zeitraums und wurden deshalb zur Bestimmung von Prozessraten in Intervalle unterteilt. Für das erste Viertel der viermonatigen Inkubation konnte eine AOM-Rate von $\sim 465\ nmol\ cm^{-3}\ Tag^{-1}$ berechnet werden. Im zweiten und dritten Viertel zeigte das Konzentrationsprofil (siehe Anhang) eine Zunahme von Methan. Die Methanogeneserate für diesen Zeitraum beträgt $\sim 232\ nmol\ cm^{-3}\ Tag^{-1}$. Im letzten Viertel sank die Me-

thankonzentration erneut ab und resultierte in einer AOM-Rate von $\sim 300 \text{ nmol cm}^{-3} \text{ Tag}^{-1}$. Das Kontrollexperiment zeigte eine geringe aber stetige Zunahme der Methankonzentration (ca. $5 \text{ nmol cm}^{-3} \text{ Tag}^{-1}$). Zur Verifizierung der gemessenen Raten, folgten Radiotracer Inkubationen mit ^{14}C -markiertem Methan und ^{35}S -markiertem Sulfat. Im Gegensatz zu der direkten Messung am GC, konnten durch diese Methode AOM-Raten von durchschnittlich nur $0,978 \text{ nmol cm}^{-3} \text{ Tag}^{-1}$ errechnet werden (siehe Abb. 8A). In den Kontrollexperimenten wurde keine AOM-Aktivität nachgewiesen.

Das arithmetische Mittel der methan-abhängigen Sulfat-Reduktionsraten zeigte eine sehr geringe Aktivität von $\sim 0,9 \text{ nmol cm}^{-3} \text{ Tag}^{-1}$. In Kontrollexperimenten ohne Methan wurde nur ein Zehntel der Aktivitäten (ca. $0,1 \text{ nmol cm}^{-3} \text{ Tag}^{-1}$) gemessen, was verdeutlicht, dass die Sulfat-Reduktion von Methan als Elektrodondonator abhängig war (siehe Abb. 8B).

Ursache für diese geringen Raten könnte sein, dass die Proben für diesen Versuchsansatz längere Zeit bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ lagerten bevor das Experiment durchgeführt wurde. Negative Auswirkungen auf die Organismen könnten daraus resultieren. Die Ergebnisse des Experiments werden im Folgenden nicht näher diskutiert.

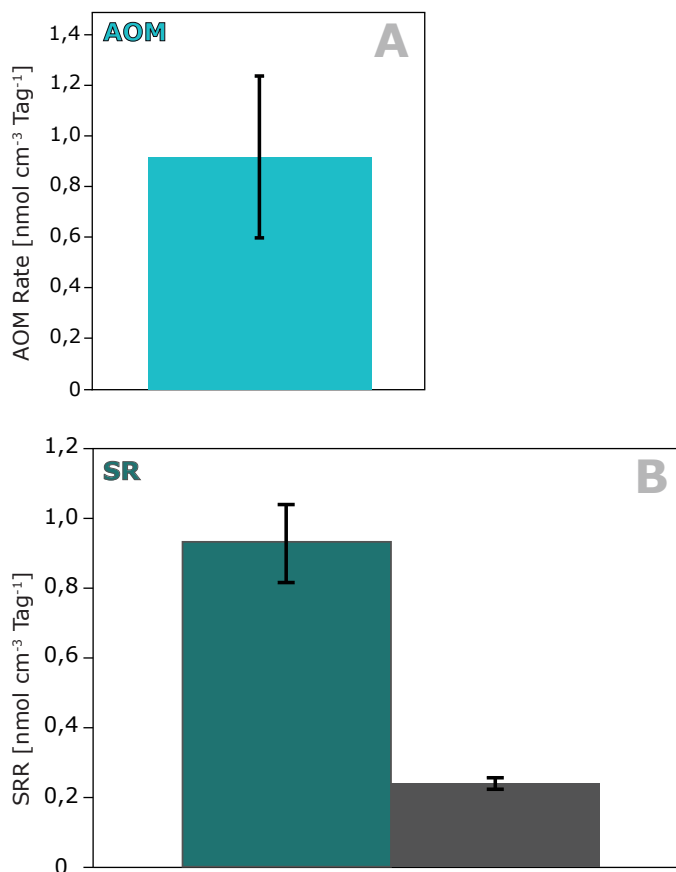


Abb. 8: AOM und SR-Raten eines Sedimentkerns (MUC 10; 2-5 cm Tiefe) aus dem Zentrum des North Alex MV

(A) AOM-Rate und (B) SRR durch Radiotracer-Experimente ermittelt. Die Kontrolle der SR ist in grau dargestellt. Die Kontrollen der AOM, zeigten keine Aktivitäten und sind deswegen nicht dargestellt. Die Raten wurden von 3 Replikaten bestimmt.

3.3 Diversitätsanalyse der bakteriellen 16S rDNA-Sequenzen

Zur Erfassung der bakteriellen Diversität konnten, nach Sequenzierung 88 16S rRNA-Gene analysiert und phylogenetisch zugeordnet werden. (Sedimenttiefe 0-1 cm n=27; 4-5 cm n=28; 29-31 cm n=33).

Ein Großteil der erhaltenen Sequenzen konnte den δ - und γ -*Proteobacteria* zugeordnet werden (vgl. Abb. 9). Auffällig an der vertikalen Verteilung ist, dass der Anteil der δ -*Proteobacteria* in der obersten Sedimentschicht (0-1 cm) bei 37 % liegt, in der mittleren Sedimentschicht (4-5 cm) hingegen, in der die höchsten AOM-Raten gemessen wurden (Treude, unveröffentlicht) nur bei 7 %. Hier dominieren die γ -*Proteobacteria* (46 %) und *Sulfurovum* (32 %), ein Vertreter der ϵ -*Proteobacteria*. Methanotrophe Bakterien der Ordnung *Methylococcales* bildeten die größte Gruppe innerhalb der γ -*Proteobacteria* in der oberen (50 %) und in der mittleren Sedimentschicht. In der tiefsten untersuchten Sedimentschicht (29-31 cm) steigt der relative Anteil der δ -*Proteobacteria* auf 73 % an, hier wurden keine Klone mit Sequenzähnlichkeiten zu γ -*Proteobacteria* gefunden.

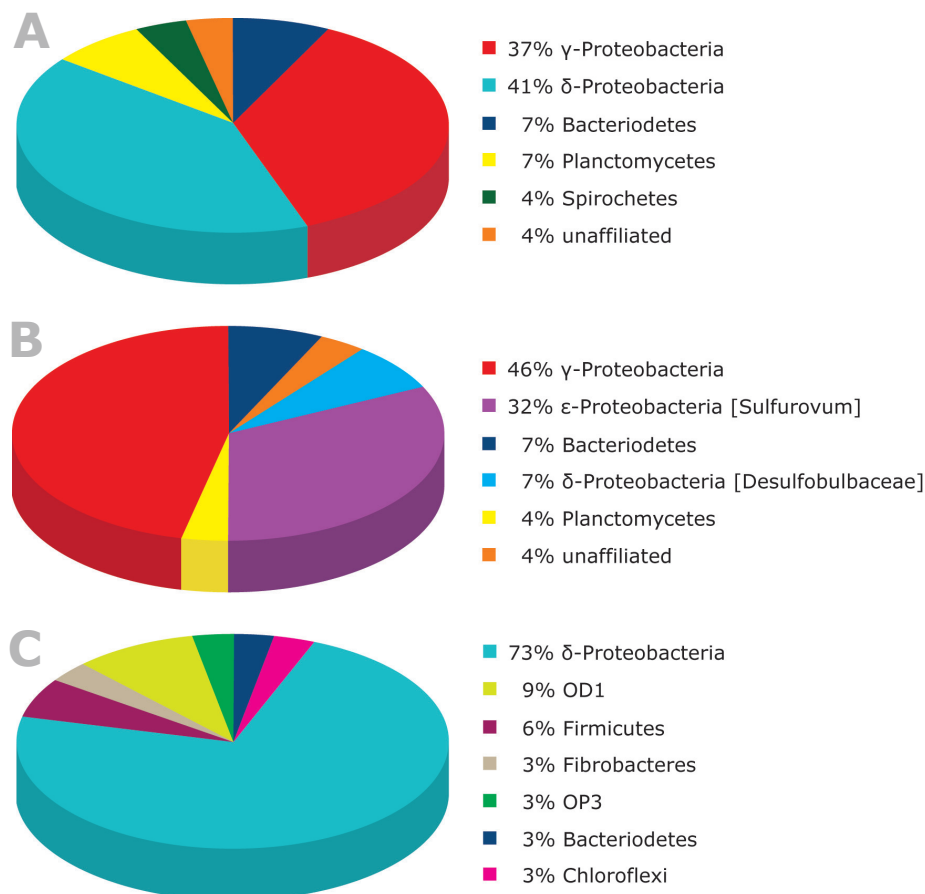


Abb. 9 Phylogenetische Analyse der bakteriellen Diversität am NAMV

Die an Hand der 16S rDNA-Sequenz identifizierten Bakterien wurden in den Diagrammen unterschiedlich farbig dargestellt. (A) zeigt die bakterielle Zusammensetzung der Sedimentschicht 0-1 cm, (B) der Sedimentschicht 4-5 cm und (C) der Sedimentschicht 29-31 cm. Insgesamt wurden 88 Klone unter Verwendung des 16S rDNA-forward (27f)-Primers sequenziert.

δ-Proteobacteria

Innerhalb der *δ-Proteobacteria* waren unter den erhaltenen Klonsequenzen drei Ordnungen vertreten: Desulfobacterales, Desulfuromonadales und Myxococcales. Wobei am häufigsten marine, sulfatreduzierende Bakterien die nächsten Verwandten darstellten. Jedoch konnte keine Sequenz den typischen Seep-Sulfatreduzierern, den *Desulfosarcina*-verwandten, zugeordnet werden.

In der Sedimentschicht 0-1 cm (siehe Abb. 10A) dominierten die Desulfobacterales (91 %), mit Vertretern der Familien Desulfobacteraceae (36 %) und Desulfobulbaceae (55 %). Die Desulfobacteraceae splitten sich zu gleichen Teilen in *Desulfobacterium* und *Desulfobacula* auf. Innerhalb der Desulfobulbaceae fanden sich 9 % der Gattung *Desulfobulbus*, welche bereits assoziiert mit ANME-3, aber auch mit ANME-2c in Sedimenten des Eel River Beckens (Pernthaler *et al.*, 2008) gefunden wurden. Weitere 9 % fielen auf *Desulfocapsa*.

Aus Sediment der Schicht 4-5 cm konnten lediglich zwei Klonsequenzen (7 %) in die *δ-Proteobacteria* gruppiert werden. Diese Klone zeigten höchste Ähnlichkeiten zu Sequenzen innerhalb der Desulfobulbaceae.

91% der Sequenzen in der untersten Sedimentschicht (29-31 cm) zeigten die größten Sequenzähnlichkeiten zu Mitgliedern der Familie Desulfobacteraceae (siehe Abb. 10B). Innerhalb dieser Familie wiesen 37 % die größten Übereinstimmungen mit *Desulfatibacillum*, weitere 21 % mit *Desulfobacterium* und 17 % mit *Desulfobacula* auf.

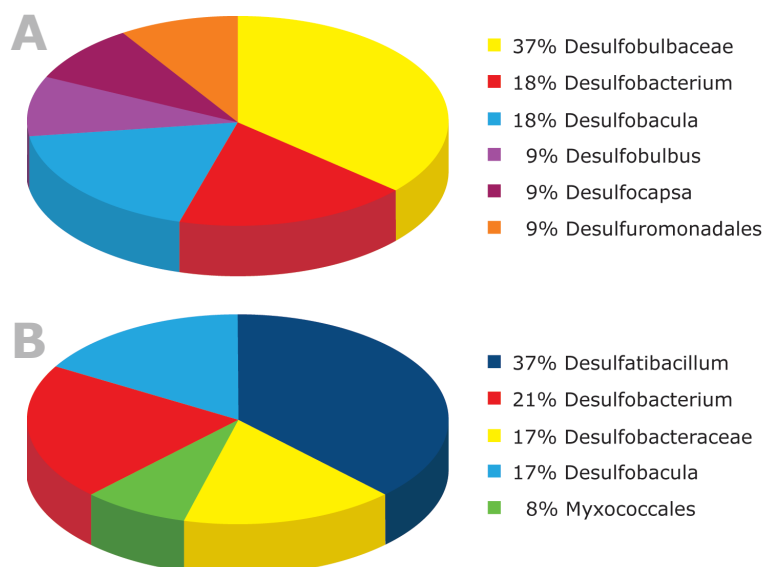


Abb. 10 Systematische Aufspaltung der *δ-Proteobacteria* am NAMV

Die an Hand der 16S rDNA-Sequenz identifizierten *δ-Proteobakterien* wurden in den Diagrammen unterschiedlich farbig dargestellt. (A) zeigt die Aufspaltung der *δ-Proteobakterien* in der Sedimentschicht 0-1 cm und (B) die der Sedimentschicht 29-31 cm. In den beiden Schichten cluster-ten insgesamt 35 Klonsequenzen innerhalb der *δ-Proteobakterien*.

3.4 Diversitätsanalyse der archaeellen 16S rDNA-Sequenzen

Nach Sequenzierung konnten 68 archaeelle 16S rRNA-Gene analysiert und phylogenetisch zugeordnet werden (Sedimenttiefe 0-1 cm n=32; 4-5 cm n=30; 29-31 cm n=6).

Die archaeelle Diversität war in allen drei Schichten gering. Innerhalb des Phylums Euryarchaeota konnten vier, bei den Crenarchaeota nur zwei phylogenetische Gruppen (Marine Group I und *Candidatus Nitrosopumilus*) identifiziert werden.

Die Phylogenetische Analyse der archaeellen Diversität der Sedimenthorizonte ist in Abb. 11 aufgeführt. Ein Großteil der Sequenzen der Sedimentschichten ließ sich in die Gruppe GOM Arc I einordnen (0-1 cm n=18; 4-5 cm n=9). Diese Gruppe wird auch ANME-2d (Martinez *et al.* 2005; Mills *et al.* 2006) genannt. Sie ist jedoch weder monophyletisch mit den anderen drei ANME-2 Untergruppen (ANME-2a,-2b,-2c), noch konnte bisher gezeigt werden, dass sie Methan assimiliert oder Konsortien mit Sulfatreduzierern bilden.

Die nächst größte Gruppe konnte dem ANME-2a Cluster zugeordnet werden.

3 % der Sequenzen der oberen Schicht und 13 % der mittleren Schicht fielen in diese Gruppe, welche Vertreter aus Habitaten aktiver AOM enthält. Niederfrequenzierte (n=1-2) Sequenzen wurden der Ordnung Thermoplasmatales als nächste kultivierte Verwandte zugeordnet.

Auf Grund von schlechter DNA-Qualität konnten in der tiefsten Schicht (29-31 cm) nur 6 Klone erfolgreich sequenziert werden. Alle zeigten die größte Sequenzähnlichkeit zu *Methanosarcina*.

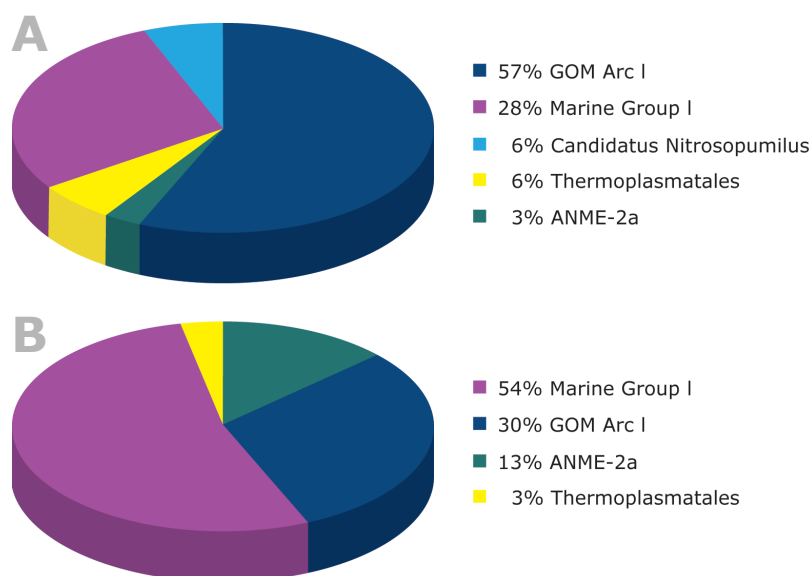


Abb. 11 Phylogenetische Analyse der archaeellen Diversität am NAMV

Die mittels der 16S rDNA-Sequenz identifizierten Archaeen wurden in den Diagrammen unterschiedlich farbig dargestellt. (A) zeigt die archaeelle Zusammensetzung der Sedimentschicht 0-1 cm und (B) der Sedimentschicht 4-5 cm. Insgesamt wurden 62 Klone unter Verwendung des 16S rDNA-Arch20forward-Primers sequenziert.

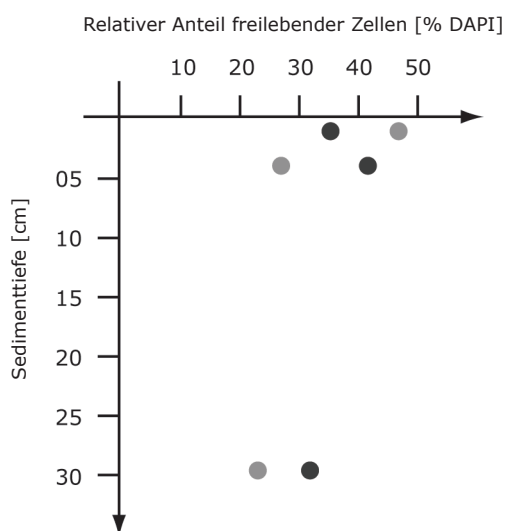
3.5 Strukturanalyse der mikrobiellen Lebensgemeinschaften am NAMV

Die Catalyzed Reporter Deposition Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (CARD FISH) wurde eingesetzt, um quantitative Aussagen über die *in situ* Abundanz verschiedener Gruppen im natürlichen Lebensraum des North Alex MV, zu treffen. Eine Übersicht der Ergebnisse ist in Tabelle 6 aufgeführt. Der Einsatz AOM-spezifischer Sonden hatte zum Ziel, die am Methanumsatz beteiligte Fraktion der benthischen Lebensgemeinschaft zu identifizieren und zu quantifizieren. Durch den Einsatz verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe war es möglich neben der vertikalen Verteilung dieser Organismen, auch die Vergesellschaftung dieser zu untersuchen. Zudem wurden Sonden eingesetzt, die Mikroorganismen der Domänen Archaea und Bacteria in den unterschiedlichen Sedimenttiefen erfassen.

Tab. 9: Ergebnisse der CARD-Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung freilebender Zellen

Sedimentkern	Sediment-tiefe [cm]	Relativer Anteil freilebender Zellen [% DAPI-gefärbte Zellen]					
		Bacteria (EUB338 I)	Archaea (ARCH915)	δ-Proteobacteria (DSS658)	(DBB660)	ANME-2 (ANME2-538)	ANME-2a (ANME2a-647)
MUC 4 North Alex MV (Zentrum)	0-1 cm	47,57	35,69	5,21	1,12	2,05	1,34
	4-5 cm	28,28	42,76	33,90	3,73	5,86	1,54
	29-31 cm	23,76	31,40	10,99	6,47	9,59	4,91

Vertikale Verteilung von Bacteria und Archaea im Sediment und die Abundanz von Aggregaten



Die Detektion von Mikroorganismen der Domänen Bacteria bzw. Archaea erfolgte mittels CARD-FISH mit den Sonden EUB338 I bzw. Arch915. Maximale Detektionen mit Bacteria wurden in einer Sedimenttiefe von 0-1 cm, das entsprach einem relativen Anteil DAPI-gefärbter Zellen von >47 %. Archaea waren in der Sedimentschicht 4-5 cm in höchsten Abundanzen zu detektieren, mit einem relativen Anteil von >42 % DAPI-gefärbter Zellen.

Abb. 12 Tiefenprofil der Bacteria/Archaea am NAMV

Tiefenprofile der relativen Abundanz von Archaea ●/Bacteria ● [% DAPI-gefärbte Zellen]. Dunkelgrau gedruckt ist der relative Anteil hybridisierter freilebender Zellen, die mit der Sonde Arch915 detektiert wurden. Hellgrau gedruckt ist der relative Anteil hybridisierter freilebender Zellen, die mit der Sonde EUB338 I-III detektiert wurden.

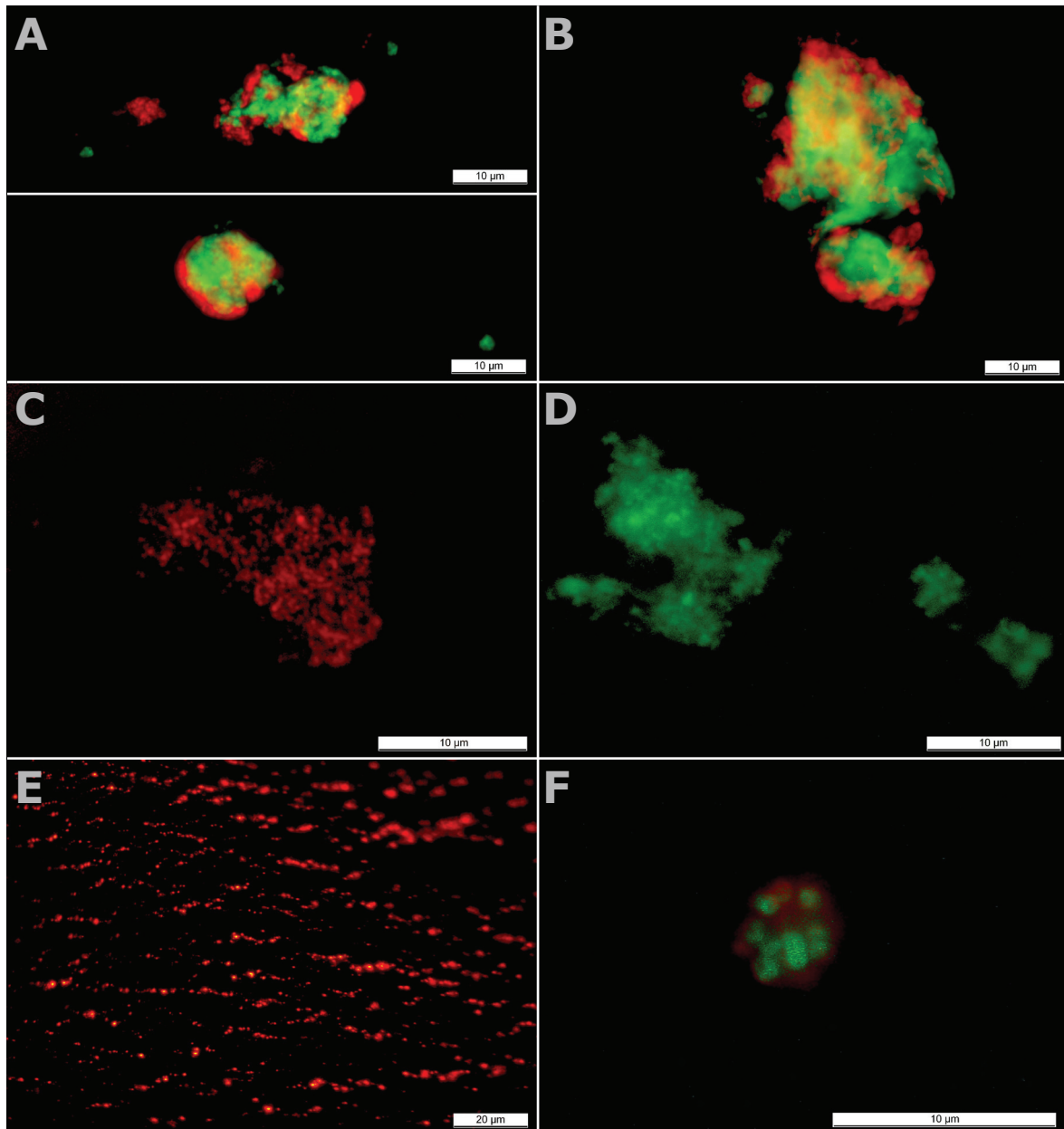


Abb. 13: Epifluoreszenzaufnahmen

Hybridisierungssignale verschiedener 16S rRNA-gerichteter Oligonukleotidsonden, visualisiert durch CARD-FISH und bestätigt durch DAPI.

(A) Mischaggregate mit Schalenstruktur, Bakterien (EUB338 I, rot) die in den zentralen Bereich der Archaeen (Arch915, grün) hineinwachsen (Sedimenttiefe 4-5 cm)

(B) kleine Konsortien die sich von Größeren ablösen (EUB338 I, rot; Arch915, grün) der Sedimenttiefe 4-5 cm.

(C) Einzelaggregate von Bakterien (EUB338 I, rot) der Schicht 29-31 cm.

(D) Einzelaggregate von Archaeen (Arch915, grün) der Schicht 29-31 cm.

(E) Hybridisierungssignale der Sonde DSS658 (*Desulfosarcina*, rot) zeigen im Sedimenthorizont 4-5 cm perl schnurartig angeordnete kleinere Zellzusammenschlüsse von Sulfat-Reduzierern.

(F) kleine Konsortien von ANME-2 (ANME 2-538, grün) mit unbekanntem bakteriellem Partner (EUB338 I, rot) der Sedimenttiefe 29-31 cm.

Wenn nicht anders angegeben entspricht der Kalibrierungsbalken 10 µm.

Während die relativen Zellzahlen für Archaea in den verschiedenen Sedimenthorizonten weitestgehend stabil blieben, war bei den bakteriellen Zellzahlen ein signifikanter Rückgang mit der Sedimenttiefe zu beobachten (siehe Abb. 12). Eine Korrektur der Zellzählungen aufgrund unspezifischer Hybridisierungssignale war nicht notwendig. CARD FISH-Signale mit der reversen EUB-Sonde NON338 lagen unterhalb der Detektionsgrenze in allen Sedimenttiefen. Die Abundanz der Aggregate unterschied sich signifikant in den untersuchten Sedimenttiefen. In der Sedimentschicht 4-5 cm stellten Aggregate aus dicht gepackten Archaea mit Bacteria assoziiert, den Großteil der Biomasse. Die Form dieser Konsortien war sphärisch bis ellipsoid. Der innere Kern bestand in den meisten Fällen aus Archaea und war von äußeren Schichten bakterieller Zellen umgeben (Abb. 13A). Auch die Ablösung kleiner Konsortien von Größeren wurde beobachtet (Abb. 13B). Die Größe der gefundenen Aggregate variierte zwischen 4-20 µm. In den Sedimenthorizonten 0-1 cm und 29-31 cm wurden kaum Vergesellschaftungen zwischen Bacteria und Archaea gefunden. Zwar wurden Ballungszentren beider Gruppen nachgewiesen, jedoch selten in Assoziation. In der unteren Schicht konnten vereinzelt Aggregate ausgemacht werden, jedoch keine Mischaggregate aus Archaea und Bacteria (Abb. 13C und D). Die Hybridisierungssignale konnten durch DAPI bestätigt werden.

Quantifizierung verschiedener phylogenetischer Gruppen

Neben der Quantifizierung sollte der Einsatz der Sonden DSS658 (*Desulfosarcina/Desulfococcus*) und DBB660 (*Desulfobulbus*), welche spezifisch verschiedene Gruppen sulfatreduzierender Bakterien erfassen, den bakteriellen Partner in den beobachteten Bacteria/Archaea-Aggregaten (4-5 cm) identifizieren. AOM-spezifische Sonden (ANME-2-538 und ANME-2a-647) wurden verwendet, um den archaeellen Partner der Konsortien zu detektieren.

Die Quantifizierung der Zellen, die von diesen Sonden erfasst werden, erfolgte in allen drei Sedimentschichten (Abb. 14).

Die Sonde DBB660 wurde ausgewählt, da die 16S rDNA-Analyse Hinweise auf das Vorkommen von *Desulfobulbus* lieferte. An der Sedimentoberfläche (0-1 cm) in der 9 % der bakteriellen Sequenzen Ähnlichkeiten zu *Desulfobulbus* aufwiesen, waren die Hybridisierungssignale deutlich niedriger (~ 1 %). Mit einer maximalen Detektion von ca. 6 % DAPI-gefärbter Zellen wurde in der Tiefe 29-31 cm die höchste Dichte gefunden (Vgl. Abb. 14A). *Desulfosarcina*-ähnliche wurden in der phylogenetischen Untersuchung nicht erfasst. Da die *Desulfosarcina*-verwandten aber meist in allen marinen Sedimenten in großer Zahl zu finden sind und bekanntermaßen Konsortien mit ANME-2a (siehe 16 S rDNA-Analyse) bilden, wurde auch die Sonde DSS658 ausgewählt.

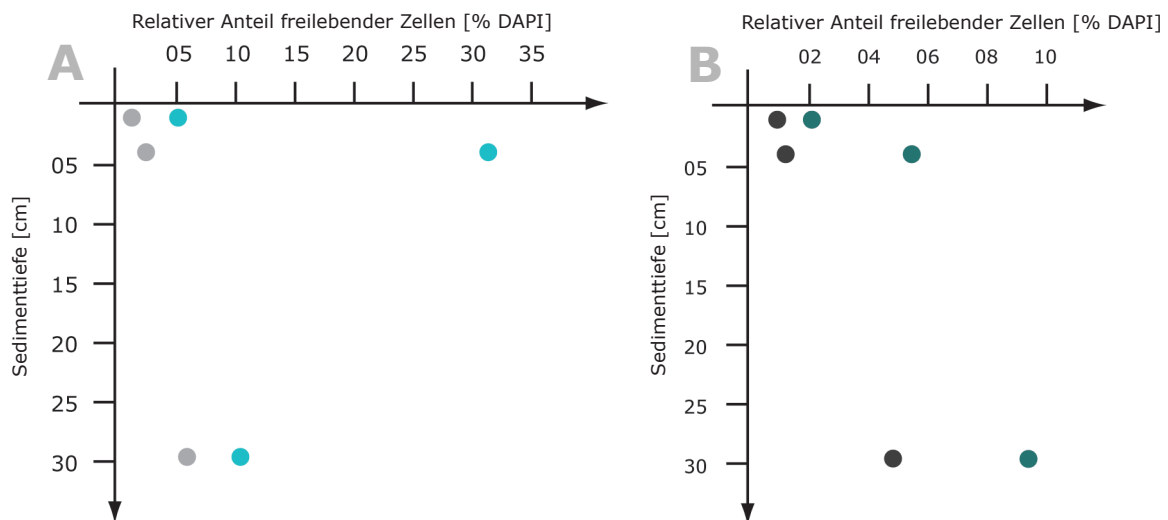


Abb. 14 Tiefenprofile AOM-assoziiierter Organismen am NAMV

Tiefenprofil der relativen Abundanz von (A) *Desulfosarcina/Desulfococcus* (●)/*Desulfobulbus* (●) bzw. (B) ANME 2 (●)/ ANME 2a (●) [% DAPI-gefärbte Zellen]. *Desulfosarcina/Desulfococcus*-Verwandte wurden mit der Sonde DSS658, *Desulfobulbus*-Verwandte mit der Sonde DBB660 detektiert. Die relative Abundanz von ANME-2 wurde mit der Sonde ANME-2-538 und ANME-2a mit der Sonde ANME-2a-647 festgestellt.

Die Sonde DSS658 detektierte die meisten Hybridisierungssignale in der Sedimentschicht 4-5 cm, mit einem relativen Anteil von ca. 34 % DAPI-gefärbter Zellen (Abb. 14A). Organismen, die von der Sonde erfasst wurden, waren meist in kleineren Zellzusammenschlüssen perlschnurartig angeordnet (Abb. 13E). Beide Sonden zeigten keine Signale in Zellen von Aggregaten und ermöglichten keine Identifizierung der vermeintlich sulfatreduzierenden Partner des ANME-Konsortiums.

Die Hybridisierungssignale der Sonde ANME-2-538, die spezifisch Vertreter der ANME-2 erfasst, zeigte in der oberflächennahen Sedimentschicht eine relative Abundanz von 2 %, in der tiefsten Sedimentschicht die meisten Hybridisierungssignale mit > 9 % DAPI-gefärbter Zellen (Abb. 14B). Hybridisierungssignale mit Zellen strukturierter, jedoch viel kleinerer Aggregate (2-4 µm, Abb. 13F) mit unbekanntem bakteriellem Partner wurden detektiert.

Die Sonde ANME-2a-647, die mit der 16S rRNA von Bakterien der Untergruppe ANME-2a hybridisiert, detektierte ebenfalls im tiefsten Sedimenthorizont den maximalen relativen Anteil hybridisierter Zellen (ca. 5 % der DAPI-gefärbten Zellen; Abb. 14B). Es konnten keine Signale mit den strukturierten Aggregaten im Sediment nachgewiesen werden.

Zur Untersuchung, ob die detektierten Konsortien des Habitats North Alex MV durch QS und QQ gesteuert werden, wurde in Vorarbeit eine Fosmid-Genombank des Sedimenthorizont 4-5 cm angelegt. Dazu wurde die genomische DNA dieser Probe mittels direkter Lyse isoliert. Nach der DNA Extraktion wurden DNA-Fragmente in das Fosmid pCC1FOS™ kloniert und mittels λ-Phagenpartikel in *E. coli* EPI 300™-T1^R transduziert.

Die Charakterisierung der Fosmidgenbank zeigte eine minimale Insertgröße von 17 kb und eine maximale Insertgröße von 40 kb, womit die mediane Insertgröße bei 31,6 kb lag. Die Inserthäufigkeit betrug 100 %. Die erstellte Metagenombank für dieses Habitat setzt sich aus 8.064 stabilen Einzelklonen zusammen, die in 84 MTP abgelegt wurden.

3.6 Screeningtests zum Nachweis AHL-produzierender Bakterien

Die Detektion von AHL-Signalmolekülen erfolgte mit Hilfe des AHL-Sensorbakteriums *C. violaceum* CV026 und dem Reporterstamm *E. coli* DH5α/pRS354. Für einen AHL-Nachweis kurzkettiger AHL-Moleküle wurde der Agarplattentest durchgeführt. Es wurden AHL-Extrakte von den 84 MTP der Metagenombank „North Alex MV“ und aus dem Überstand des Sediment-Medium-Gemischs getestet.

Mit dem Biosensor *C. violaceum* CV026 konnten keine AHL-Signalmoleküle über eine violette Pigmentierung der Indikatorplatten um die jeweiligen Auftragungspunkte nachgewiesen werden.

Der Reporterstamm *E. coli* DH5α/pRS354 konnte in der MTP 12 AHL-Signalmoleküle detektieren. Jedoch konnten keine AHL-Signale bei den Einzelklonen der MTP 12 nachgewiesen werden und somit die AHL Moleküle nicht näher charakterisiert werden (Ergebnisse nicht dargestellt).

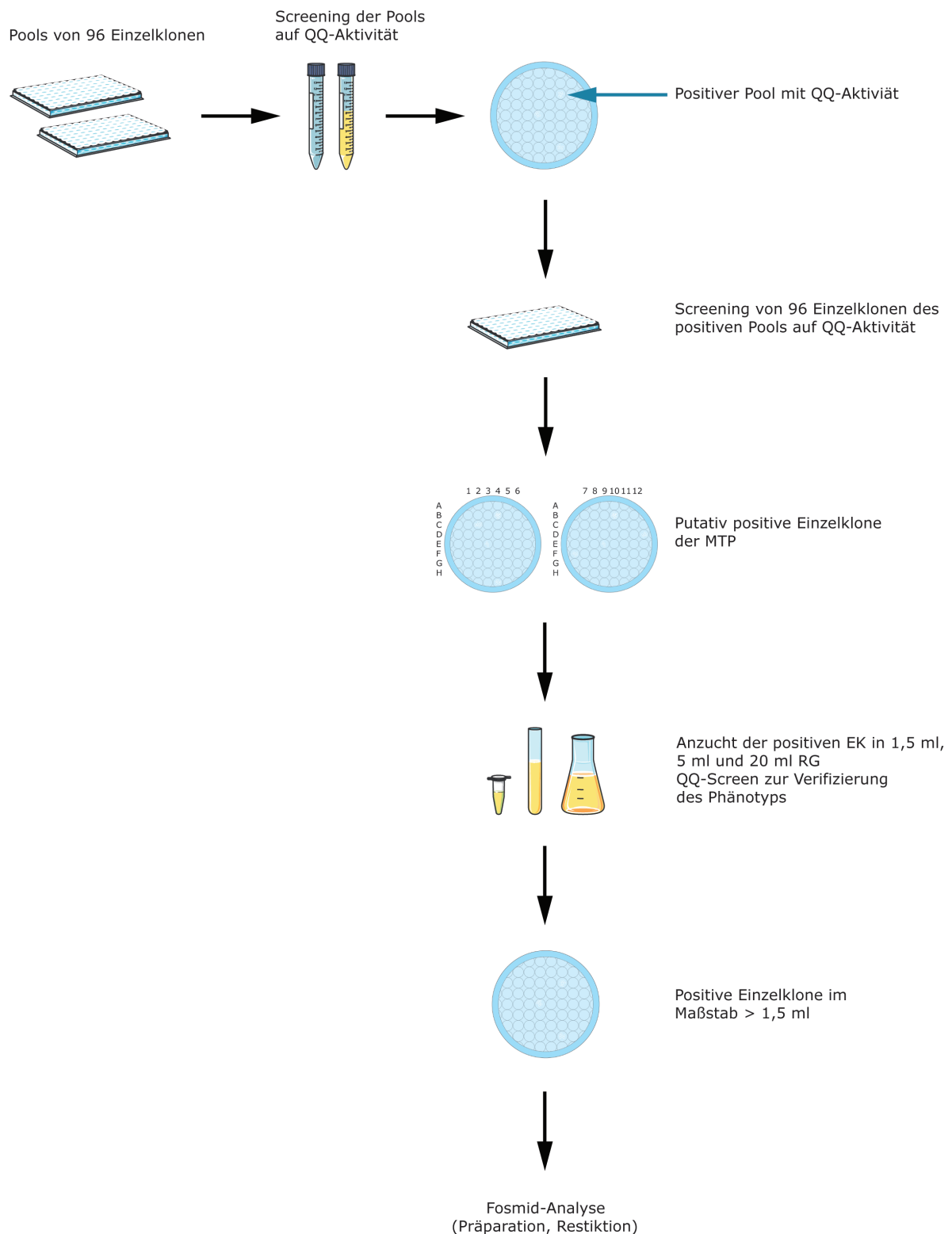


Abb. 15 Schematische Darstellung des Screeningablaufs einer Metagenombank auf QQ-Aktivität.

Das Laufschemata zeigt das QQ-Screening-Verfahren beginnend mit der Erstellung von Pools pro 96 Klonen (MTP) einer Metagenombank bis hin zum positiven Einzelklon einer MTP. Die QQ-Aktivität wird durch Wachstum der Reporterstämme angezeigt.

3.7 Durchmusterung der Metagenombank auf QQ-Aktivität

QQ-Aktivitäten der angelegten Metagenombank „North Alex MV“, wurde durch Wachstum der beiden Reporterstämme *E. coli* DH5 α /pRS354 und *E. coli* DH5 α /pRS356 auf den Screening-Platten angezeigt. Eine schematische Darstellung vom Ablauf der Untersuchung einer Genombank auf QQ-Aktivität ist in Abbildung 15 dargestellt.

Im initialen Schritt wurden die Pools (96 Klone) der 84 MTP auf Interferenz gegenüber AHL und AI-2 im Überstand und Zellextrakt getestet. Insgesamt interferierten 22 Pools im Überstand, sowie 7 Pools im Zellextrakt mit AHL. Weiterhin zeigten 8 Pools im Überstand und 2 Pools im Zellextrakt AI-2-Interferenz.

Im Folgenden wurde eine Auswahl von je 4 positiven Pools, die QQ-Aktivität simultan gegenüber beiden Signalmolekülen im Überstand zeigten, getroffen. Die entsprechenden MTP-Pools wurden daraufhin im 96er-Plattenmaßstab durchmustert, indem jeder Klon der MTP, mit Hilfe 48er-Metallstempel, auf die Screening-Platten übertragen wurde. Mehr als 9 % der Einzelklone zeigten AHL-Interferenz, gegenüber AI-2 interferierten ca. 2 % der Klone. Acht putativ positive Einzelklone, die eine starke QQ-Aktivität gegenüber beiden Signalmolekülen zeigten, wurden für weitere Analysen ausgewählt.

Die ausgewählten Klone wurden in größeren Volumina (in 1,5 ml, 5 ml oder 20 ml LB-Cm) angezogen und der zellfreie Überstand der Kulturen erneut getestet. Für zwei Klone (37/F10 und 79/E4) wurde der Phänotyp bestätigt, eine starke QQ-Aktivität simultan gegenüber AHL und AI-2 war nachweisbar.

3.8 Subklonierung

Die identifizierten QQ vermittelnden Fosmide wurden molekularbiologisch untersucht. Hierbei zeigte sich, dass zwei unterschiedliche Fosmide vorlagen mit einem inserierten DNA-Fragment von >20 kb bei dem Klon 37/F10 und einem inserierten DNA-Fragment von ca. 17,5 kb bei dem Klons 79/E4. Nach Restriktionshydrolyse mit *EcoRI* konnten von dem Klon 37/F10 5 Banden mit Größen zwischen 3000 bp und > 10.000 (Abb. 16A-E) eluiert werden.

Die Restriktionshydrolyse des Klons 79/E4 mit *BamHI* resultierte in der Elution von 6 Banden mit Insertgrößen zwischen 2000 bp und >10.000 (Abb. 16A-F). Die eluierten Banden wurden in den Vektor pDrive kloniert. Je Platte wurden dreimal unabhängige 1,5 ml LB-Amp-Flüssigkulturen der Klone angezogen und auf QQ-Aktivität im Überstand gegenüber AHL und AI-2 untersucht.

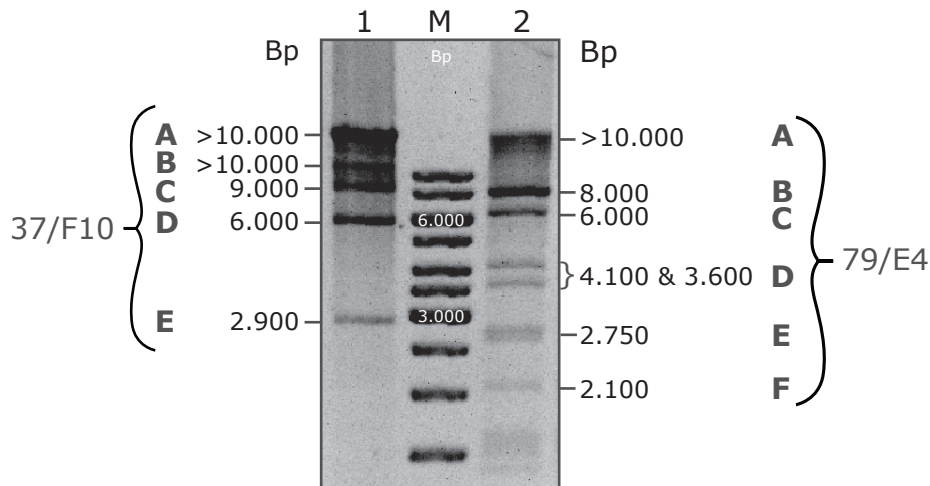


Abb. 16 Restriktionsanalyse der Fosmiden 37/F10 und 79/E4

Zur Einschränkung des QQ-vermittelnden Insertbereichs wurden die Fosmide der Klone 37/F10 mit *EcoRI*, bzw. 79/E4 mit *BamHI* restringiert und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die eluierten Banden sind mit Buchstaben beschriftet. Das linearisierte Fosmid läuft auf Höhe von 8,1 kb. M, 1 kb Marker (Fermentas); Spur 1, Restriktion von Fosmid-DNA des Klons 37/F10 mit *EcoRI*; Spur 2, Restriktion mit *BamHI* (79/E4).

Screening der Subklone auf QQ-Aktivitätsverlust

Im Screen der Subklone wurden solche Klone als positiv beurteilt, deren Überstände ein Wachstum der Reporterstämme hervorriefen, d.h. deren Insert die verantwortliche DNA-Region für die QQ-Aktivität trug.

Isolierten Plasmid-DNA (300 ng) wurde von den positiven Subklonen 37/F10 E (pRS628, Insertgröße ~ 3000 bp) und 79/E4 E (pRS629, Insertgröße ~ 2800 bp) mit Insert-flankierenden Primern (M13 for/rev) ansequenziert und anschließend mittels *Primer walking* das vollständige Insert doppelsträngig sequenziert. Beide Subklone trugen das kleinste Insert, das gleichzeitig zu keinem QQ-Aktivitätsverlust gegenüber AHL und AI-2 führte.

3.9 Identifikation Protein-kodierender offener Leserahmen auf pRS628 und pRS629

Mit dem Programm „*CodonCodeAligner*“ (CodonCode Corporation) wurde aus 6 Teilsequenzen des Subklons *E. coli* DH5a/pRS628 ein Contig mit einer Länge von 3.587 bp erstellt. Das Contig des Klons *E. coli* DH5a/pRS629 verfügte über eine Länge von 2.907 bp.

Mit dem Programm *ORF Finder* (open reading frame finder) des NCBI („National Center for Biotechnology Information“) wurden kodierende Bereiche auf den inserierten DNA-Fragmenten der Subklone *E. coli* DH5a/pRS628 und *E. coli* DH5a/pRS629 (siehe Abb. 17) identifiziert und auf Sequenzübereinstimmungen in der Datenbank geprüft.

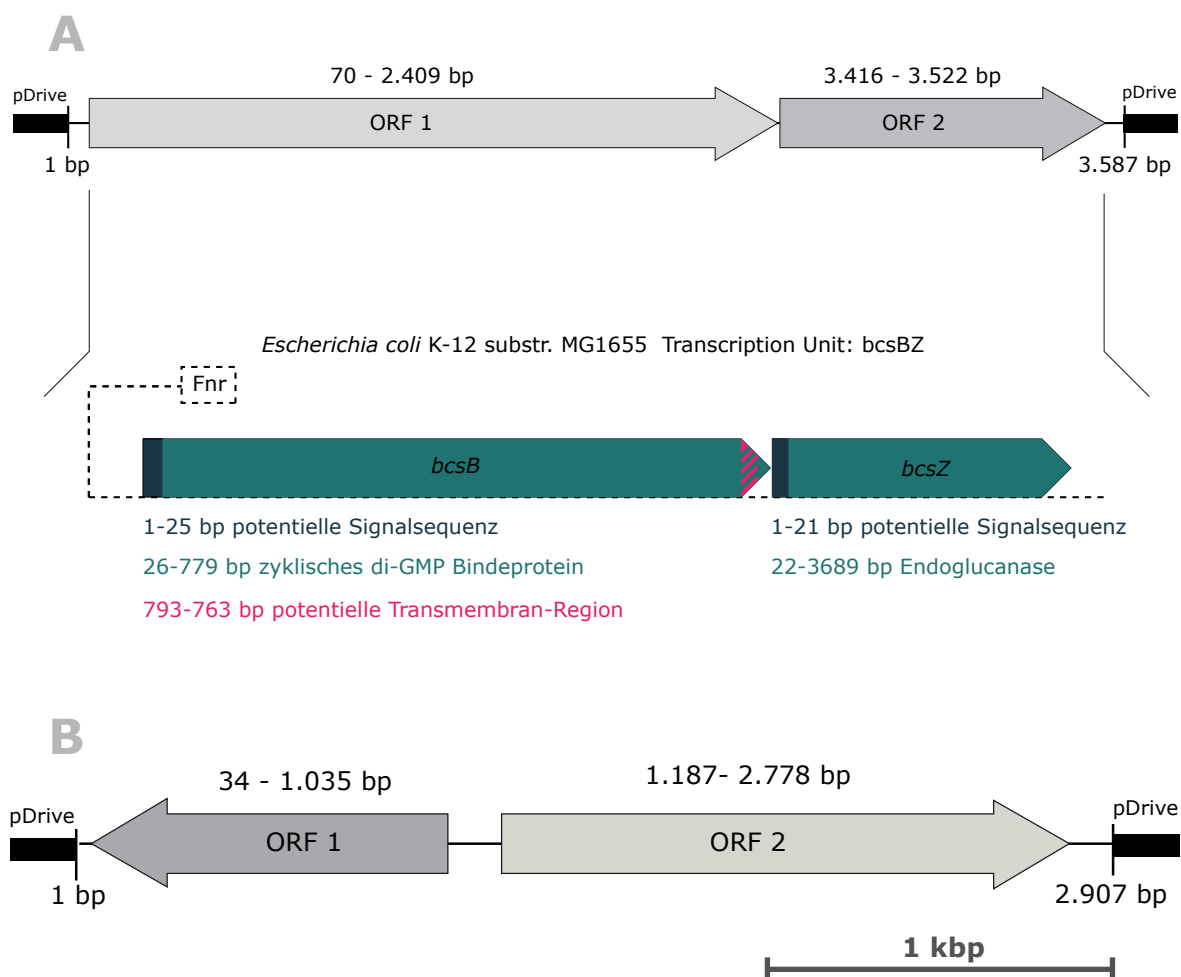


Abb. 17 Insetierte DNA-Fragmente der Klone *E. coli* DH5a-/pRS628 und -pRS629

(A) Insetbereich des Plasmids pRS628. Dargestellt ist der Contig aus 6 assemblierten Sequenzen mit einer Größe von 3.587 bp. Zwei hochsignifikante ORFs mit einer Größe von 2.340 bp (ORF 1), bzw. 1.107 bp (ORF 2) wurden als putative Transkriptionseinheit *bcsBZ* aus *E. coli* str. K12 substr. MG1655 identifiziert.

(B) Insetbereich des des Plasmids pRS629. Dargestellt ist der Contig aus 6 assemblierten Sequenzen mit einer Größe von 2.907 bp und zwei signifikanten ORFs in verschiedenen Leserastern. ORF 1 ist 1.002 bp und ORF 2 1.596 bp lang.

3.10 Sequenzanalyse des Klons *E. coli* DH5a/pRS629

Der Contig des sequenzierten Inserts des Klons *E. coli* DH5a/pRS629 hatte eine Größe von 2.907 bp. Mittels *ORF Finder* konnten neun offene Leserahmen identifiziert werden, von denen jedoch nur zwei signifikante Ergebnisse lieferten.

Der erste, gleichzeitig größte ORF (Score = 516; E-Value = 2e-144) wurde im zweiten Leseraster identifiziert und hatte eine Größe von 1.596 bp (532 AS). ORF 1 erzielte die längste Sequenzübereinstimmung mit dem sigma 54 abhängigen Transkriptionsregulator von *Candidatus Solibacter usitatus Ellin6076*, einem Vertreter der Acidobacteria. Die beiden Sequenzen sind bis zur Aminosäure 522 zumindest ähnlich. Absolut identisch ist die Übereinstimmung in 269 Aminosäuren. Alle weiteren Ergebnisse mit signifikanten Sequenzähnlichkeiten zeigten Proteine mit Interaktions-Domänen für σ^{54} -Domäne aus marinen Organismen der δ -Proteobacteria.

Der zweite Leserahmen (ORF 2) kodiert für ein 334 AS großes Protein. Mittlere Sequenzähnlichkeiten wurden bei einem E-Wert von 5e-41 mit einer Vault Protein Inter-alpha-Trypsin Untereinheit aus *Syntrophobacter fumaroxidans* MPOB erzielt. Die Aminosäuresequenz des ORFs weist Übereinstimmungen mit zwei konservierten „vault protein inter-alpha-trypsin“ (VIT)-Domänen auf. Eine der VIT-Domänen wurde im N-Terminus einer „vonWillebrand factor type A“ (vWA)-Domäne in den schweren Ketten des Inter-alpha-Trypsin-Inhibitors (ITIH) gefunden.

Nach der Sequenzanalyse konnte kein ORF eindeutig, im Hinblick auf die Vermittlung von QQ-Aktivität, bestimmt werden. Die Inaktivierung eines der Gene mit anschließendem Aktivitätstest sollte Aufschluss darüber geben.

Strategie zur Identifikation des QQ-ORFs von *E. coli* DH5a/pRS629

Nach der Sequenzanalyse des inserierten DNA-Fragments von *E. coli* DH5a/pRS629 konnte keiner der beiden angezeigten ORFs hinsichtlich der Vermittlung von QQ-Aktivität ausgeschlossen werden. Hier sollte durch Inaktivierung eines ORFs herausgefunden werden, welches Genprodukt mit AHL/AI-2 interferiert. pRS629 (Abb. 17) wurde mit *Bgl*II geschnitten und nach Abbau der überhängenden Enden mittels Mung bean Nuklease die Enden religiert. Die Eliminierung der *Bgl*II-Schnittstelle konnte nicht bestätigt werden. Aus Zeitgründen konnte der entsprechende QQ-vermittelnde ORF nicht identifiziert werden.

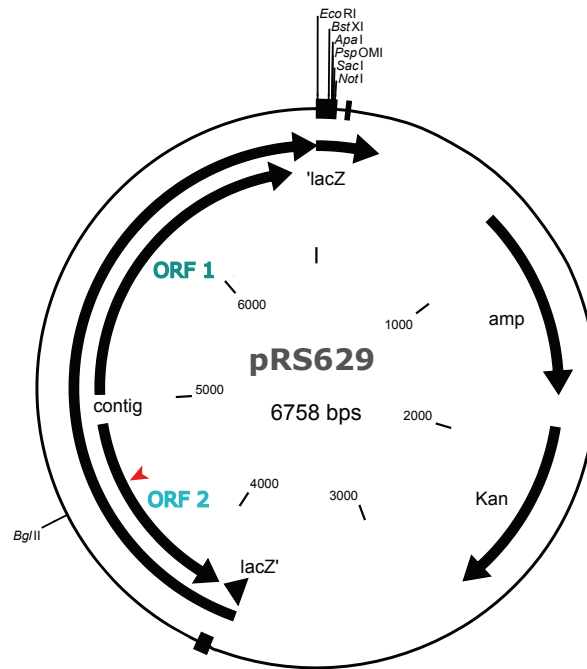


Abb. 18: Plasmidkarte von pRS629

Plasmidkarte von pRS629 des Subklons 79/E4 E. Dargestellt sind wichtige Restriktionsschnittstellen. Der rote Pfeil zeigt die *Bgl*II-Schnittstelle an.

3.11 Sequenzanalyse des Klons *E. coli* DH5a/pRS628

Das inserierte DNA-Fragment des *E. coli* DH5a/pRS628 hatte einer Gesamtgröße von 3.587 bp. Es wurden zwei signifikante ORFs, mit Größen von 2.340 bp (779 AS), bzw. 1.107 bp (368 AS), identifiziert.

Die Sequenzähnlichkeitssuche mittels *blastp* identifizierte ORF 1 (2.340 bp) als zyklischen di-GMP Bindeprotein (*bcsB*) aus *Escherichia coli* str. K12 substr. MG1655. Die beiden Sequenzen zeigen über den gesamten Bereich eine 99 % ige Übereinstimmung. Alle angezeigten Alignments deuteten auf das gleiche Genprodukt aus verschiedenen Enterobakterien hin.

Die Sequenz des ORF 2 (1.107 bp) konnte als endo-1,4-D-glucanase (*bcsZ*) identifiziert werden. Der gesamte Bereich (368 AS) zeigte eine 100%ige Übereinstimmung mit dieser Cellulase aus *Escherichia coli* str. K12 substr. MG1655. Auch alle weiteren Ergebnisse zielten auf dieses bakterielle Enzym aus verschiedenen Mikroorganismen.

Die beiden ORFs des sequenzierten Inserts liegen 6 bp auseinander und nehmen zusammen >96 % (3447 bp) des Inserts ein. Es scheint eine Operonstruktur vorzuliegen (Abb. 15). Im folgenden sollte ORF 1 näher untersucht werden. Hierfür wurde der ORF in einen Expressionsvektor inseriert und kloniert.

Die Klonierungsstrategie zur Überexpression des ORFs ist in Abb. 19 dargestellt.

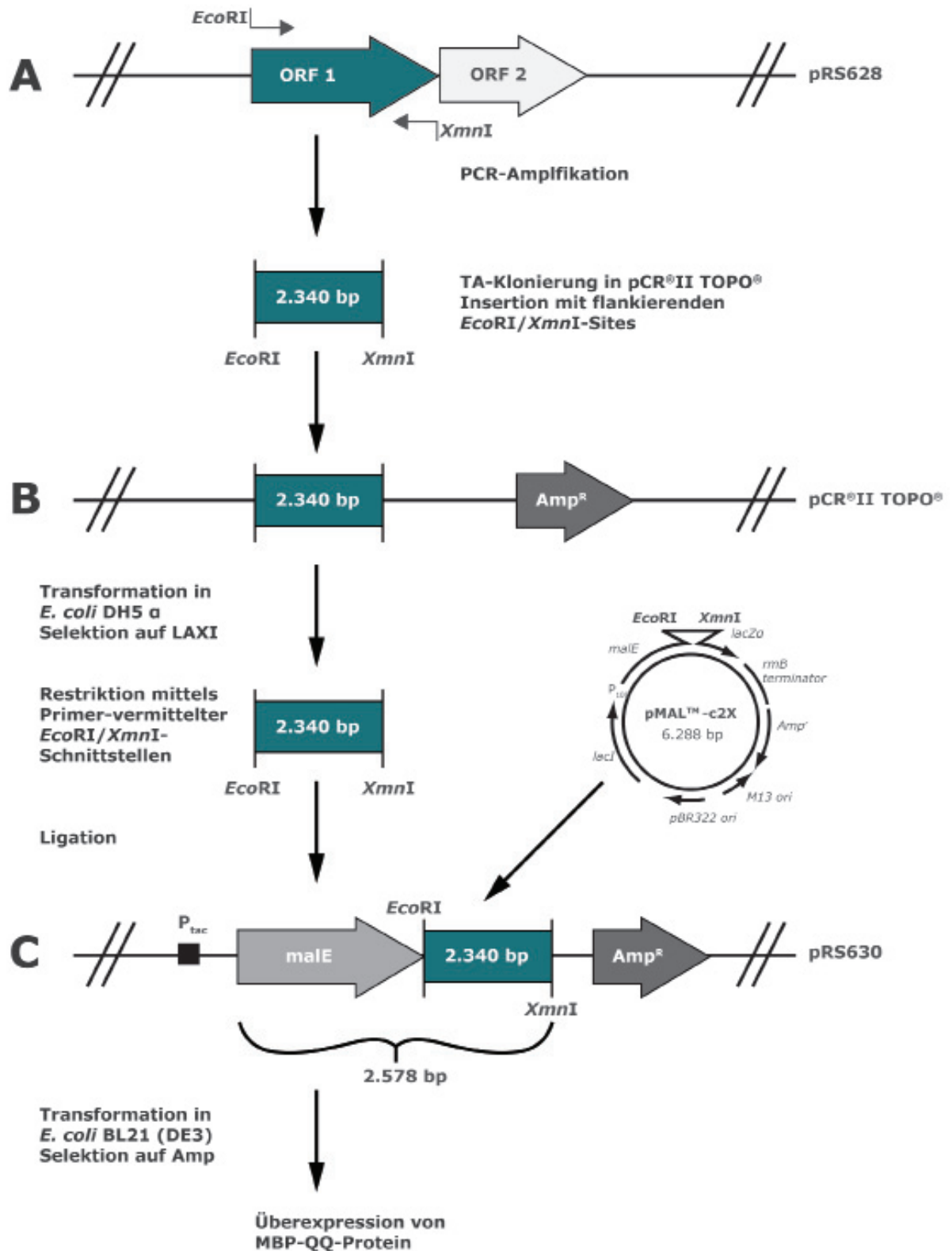


Abb. 19: Klonierungsstrategie zur Überexpression des MBP-QQ-Proteins

(A) putative QQ-ORF von *E. coli* DH5 α /pRS628 wurde mittels PCR mit Plasmid-DNA als Template amplifiziert und (B) über Ligation in den geschnittenen pCR®II TOPO® eingefügt und in *E. coli* DH5 α transformiert. Durch Restriktionshydrolyse über Primer-vermittelte $EcoRI/XmnI$ -Schnittstellen wurde das putative QQ-Gen isoliert und (C) in das geöffnete Plasmid pMAL™-c2X inseriert. Durch die Transformation in *E. coli* BL21 (DE3) konnte das MBP-QQ-Protein überexprimiert werden.

3.12 Überexpression und Affinitätschromatographie von QQ 1

Der ORF 1 (~ 2,3 kb-Fragment) des *E. coli* DH5 α /pRS628 wurde in *Eco*RI/*Xmn*I-Schnittstelle des Überexpressionsvektors pMALTM-c2X ligiert und anschließend in kompetente Zellen des *E. coli*-Stammes BL21 (DE 3) transformiert.

Das QQ-Protein QQ 1 wurde in Fusion mit dem Maltosebindeprotein (MBP) in einer 10 ml Kultur (LB) von *E. coli* DH5 α /pRS30 überproduziert. Die Induktion mit 0,3 mM IPTG erfolgte bei einer Zelldichte von OD₆₀₀ = 0,6. Nach 2 h wurden die Zellen gerntet und mittels Frenchpress aufgeschlossen. Der gewonnene Rohextrakt wurde über einen 0,45 μ m Sterilfilter filtriert und dadurch von zellulären Resten befreit. QQ 1 wurde chromatographisch über eine Amylose-Resinmatrix mit einem Säulenvolumen von 1 ml aufgereinigt. Die Elution erfolgte mittels 10 mM Maltose in CB-Puffer. Durch die Untersuchung mittels SDS-PAGE wurden die Fraktionen mit dem QQ 1 identifiziert und vereint. Zur Größenbestimmung wurden 5 μ g in einer SDS-PAGE mit 8 %igem Trenngel und PPM-Marker aufgetragen (Abb. 20). Der Rest wurde aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und zur weiteren Verwendung bei - 70 °C gelagert.

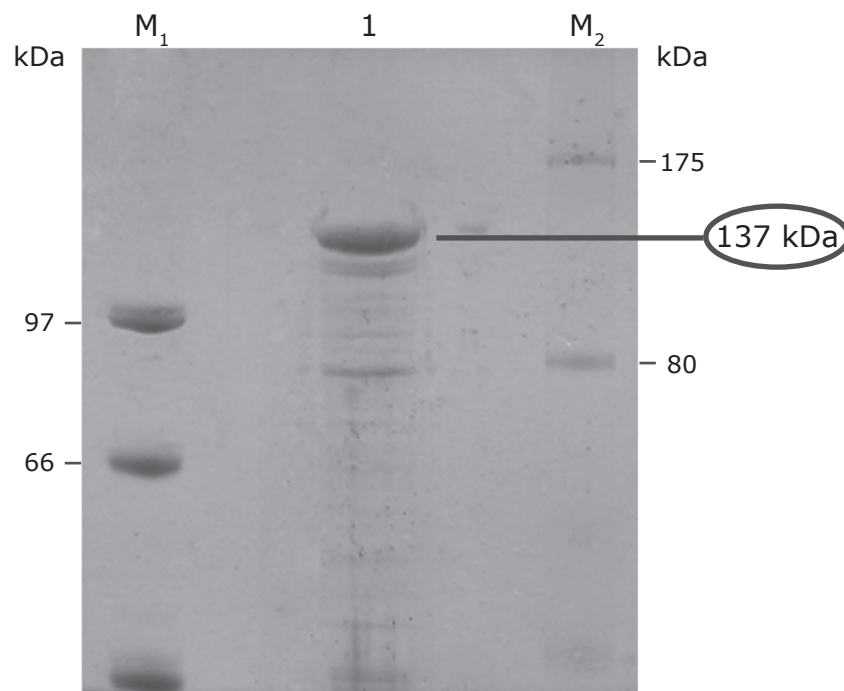


Abb. 20: Aufreinigung von MBP-QQ-Protein mittels Affinitätschromatographie.

QQ 1 wurde nach Induktion mit 0,3 mM IPTG in *E. coli* BL21 (DE3) überexprimiert. Nach Zellernte und -aufschluß wurde QQ 1 mittels Amylose-Resin aufgereinigt. Ein Aliquot der drei vereinten Elutionsfraktionen, die das Fusionsprotein ~ 137 kDa (MBP: 42,5 kDa und QQ-Protein: 86,1 kDa) enthielten, wurden mit 2 fach SDS-Ladepuffer versetzt und in einem 8 %igen Trenngel durch SDS-PAGE gelelektrophoretisch aufgetrennt. Spur 1: vereinte Eluate (5 μ g); M₁: 2 μ l Größenstandard LMW (Pharmacia, Amersham); M₂: 2 μ l Größenstandard PPM (NEB, Schwalbach)

3.13 Überprüfung des gereinigten Proteins QQ 1

Das überexprimierte MBP-Fusionsprotein QQ 1 wurde auf QQ-Aktivität gegenüber AHL und AI-2, in Abhängigkeit der Proteinzugabe, getestet.

Dazu wurden 20 µg des Proteins und Verdünnungen (1:10, 1:100, 1:500, 1:1000 und 1:5000) auf die Screening-Platten aufgetropft. An Hand des Wachstums der Reporterstämmen konnte die minimale Proteinmenge für die Interferenz mit den Signalmolekülen abgeschätzt werden.

Das QQ-Protein wechselwirkte mit AI-2 bis zu einer Zugabe von ~ 200 ng in ausreichender Weise, bei AHL reichten ~ 40 ng um den Effekt des Signalmoleküls zumindest teilweise zu überlagern. Eine deutliche Interferenz zeigte sich bei beiden Autoinducern bis zu einer Proteinverdünnung von 1:10, das entspricht einer Proteinmenge von ca. 2 µg (Abb. 21)

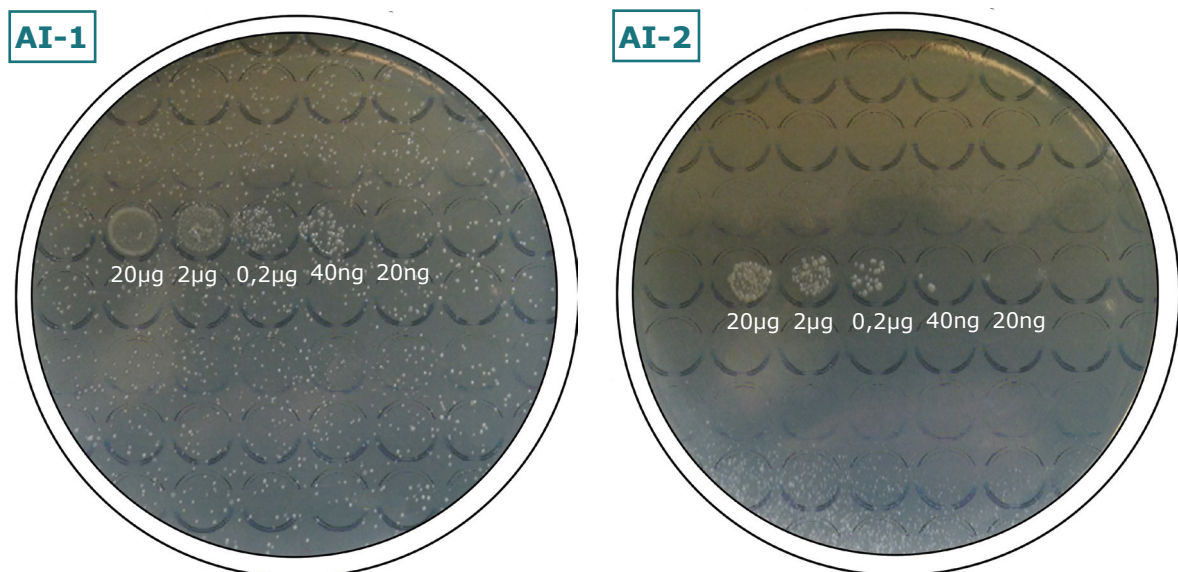


Abb. 21: Bestimmung der QQ-Aktivität in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration.

Nach Überexpression des putativen QQ-ORFs als MBP-Fusionsprotein in *E. coli* BL21 (DE3) und chromatographischer Aufreinigung des QQ-Proteins über eine Amylose-Resinmatrix wurden 20 µg der Proteinlösung und Verdünnungen (1:10; 1:100; 1:500; 1:1000; 1:5000) auf Testplatten mit den Reporterstämmen *E. coli* DH5α/pRS354 (links), bzw. pRS356 (rechts) aufgetropft und nach 16 h Inkubation bei 37 °C ausgewertet.

3.14 Effekt von QQ 1 auf das Schwärmverhalten bei *E. coli* BL21 (DE3)

Das Schwärmen bei *E. coli* kann durch AI-2 inhibierende Substanzen unterdrückt werden (Barrios *et al.*, 2006).

Die Schwärmfähigkeit des Klons *E. coli* DH5 α /pRS630 im Vergleich zu *E. coli* BL21 (DE3) wurde getestet, um nachzuweisen, dass das exprimierte Protein QQ 1 tatsächlich Interferenz gegenüber AI-2 vermittelt. Als Kontrolle diente der *E. coli*-Stamm K12, da dieser ein ausgeprägtes Schwärmverhalten auf Schwärmmagar zeigt.

Für den Test wurden frische üN-Flüssigkulturen der *E. coli*-Stämme BL21 (DE3) und K12, sowie des Klons *E. coli* DH5 α /pRS630 hergestellt. Die Komplementierung des Schwärmmagars erfolgte mit 4 % (w/v) Glukose und 30 μ M IPTG. Die angetrockneten Platten wurde mit den üN-Kulturen beimpft und nach 48 h Inkubation bei 37 °C ausgewertet.

Der Nachweis auf Schwärmfähigkeit zeigte, dass das rekombinante Fusionsprotein von *E. coli* DH5 α /pRS630 das Schwärmen in *E. coli* BL21 (DE3) deutlich einschränkte (Abb. 22).

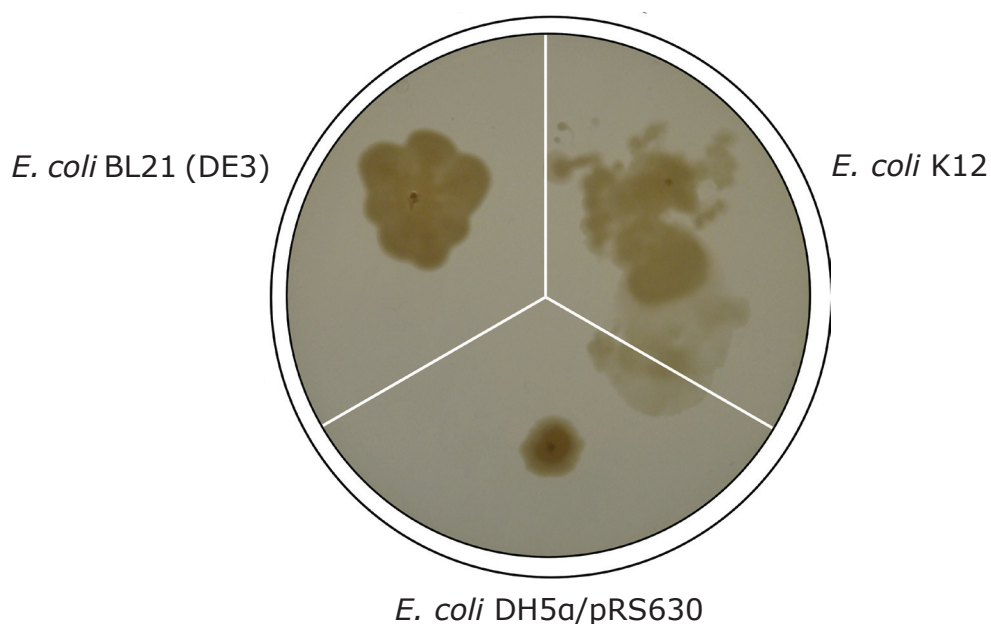


Abb. 22: Schwärmtest mit dem *E. coli* BL21 (DE3) Klon *E. coli* DH5 α /pRS630 auf Platte nach 48 h Inkubation bei 37 °C.

Die Platte wurden mit je 1 μ l von Flüssigkulturen der entsprechenden *E. coli*-Stämme angeimpft und für 48 h bei 37 °C inkubiert. *E. coli* DH5 α /pRS630: *E. coli* BL21 (DE3) mit inseriertem QQ-ORF in pMALTM-c2X; *E. coli* BL21 (DE3): Kontrolle, ohne Vektor; *E. coli* K12: Kontrolle, ohne Vektor.

4. DISKUSSION

North Alex (NAMV) ist ein aktiver submariner Schlammvulkan am oberen Hang in der westlichen Provinz des Nil-Tiefseefächers. Ein Indikator für die Aktivität von Schlammvulkanen ist der Temperaturgradient in den Sedimenten. So werden steile Temperaturgradienten durch den Aufstieg warmer Fluide mit hohen Geschwindigkeiten oder durch warme Schlammextrusionen verursacht (Feseker *et al.*, 2008). Es konnte gezeigt werden, dass die Aktivität des North Alex in den Jahren 2003 bis 2008 stark variierte und sich vermutlich in besonders aktive Phasen und Ruhephasen gliedern lässt (Feseker *et al.*, 2009). Hohe Temperaturgradienten im Zentrum des Schlammvulkans sind ein Indiz dafür, dass North Alex zum Zeitpunkt der Probennahme besonders aktiv war: Temperaturen von bis zu 70 °C wenige Meter unter dem Meeresboden übertreffen alle bisher an anderen Schlammvulkanen weltweit gemessenen Werte (Feseker *et al.*, 2009). Zudem wurden im zentralen Bereich des Schlammvulkans Gasaustritte beobachtet, die sich auch in der gasdurchsetzten Konsistenz der genommenen Sedimentkerne widerspiegeln. Methankonzentrationen im Porenwasser der Sedimentkerne aus dem Zentrum erreichten Werte bis zu 2,5 mM, wobei in der Grenzschicht zur Wassersäule noch 0,2 mM Methan gemessen wurde (unveröffentlichte Daten T. Treude).

Vergleichsweise zeigen Gebiete in der Nähe von Pockennarben („pockmarks“) oder Karbonaten des mittleren und unteren Hang des Nil-Tiefseefächers keine oder nur sehr geringe Methananomalien (Bayon *et al.*, 2009). Dementsprechend wurden in Sedimentkernen dieser Gebiete nur 10 µM Methan gemessen (Omoregie *et al.*, 2009).

4.1 Anaerobe Oxidation von Methan

Zur Untersuchung der Auswirkung von Temperaturänderungen auf die Aktivitäten der AOM in den Sedimenten des North Alex MV wurden im Labor Inkubationsexperimente unter methanhaltiger Atmosphäre durchgeführt. In den Sedimentproben zeigte die anaerobe Oxidation von Methan, gekoppelt an die Sulfatreduktion ein mesophiles Temperaturoptimum bei 23 °C. Die Sulfatreduktion war eindeutig von einem Zusatz von Methan als Elektronendonator abhängig. Bei 16 °C, nahe der *in situ* Temperatur von ~ 14 °C (mündliche Mitteilung T. Feseker) konnten nur noch die Hälfte der AOM-Aktivitäten gemessen werden. Dies deckt sich mit den *in vitro* Experimenten von Boetius *et al.* (2008), die zeigten, dass das Temperaturoptimum für AOM 5-10 °C über der tatsächlichen *in situ* Temperatur liegt. Bei höheren und niedrigeren Temperaturen nahm die Rate der Sulfatreduktion mit Methan als Elektronendonator stark ab. Das zeigt, dass die Populationen des Schlammvulkans weder an kalte noch an sehr war-

me Bedingungen adaptiert sind und wie eng begrenzt der Bereich der höchsten Aktivität ist.

Im Gegensatz zu anderen bekannten Schlammvulkanen (z.B. Håkon Mosby; Niemann *et al.*, 2006) konnte für North Alex gezeigt werden, dass die höchsten AOM-Aktivitäten im aktiven Zentrum erzielt werden, mit abnehmenden Raten zum Kraterrand hin (unveröffentlichte Daten T. Treude). Der Temperaturgradient im Sediment kann Methanflüsse anzeigen, da sich das Sediment durch den Transport von methanreichen Fluiden, Gasen und Schlamm aus tieferen Schichten erwärmt (Niemann *et al.*, 2006; De Beer *et al.*, 2006). Parallel zur Probenahme durchgeführte *in-situ* Temperaturmessungen weisen auf einen Temperaturgradienten von etwa $7,09 \text{ }^\circ\text{C m}^{-1}$ für die Position des Vergleichskerns hin und belegen somit, dass der Vergleichskern direkt aus dem sehr aktiven Zentrum geborgen wurde (unveröffentlichte Daten T. Feseker). Für den in dieser Arbeit untersuchten Kern kann dagegen ein deutlich niedrigerer Temperaturgradient von $2,04 \text{ }^\circ\text{C m}^{-1}$ angenommen werden (mündliche Mitteilung T. Feseker).

In Sedimenten mit hohem Porenwasseraufstrom wird die Sulfatpenetration aus der Wassersäule in das Sediment behindert (Niemann *et al.*, 2006). Trotz des vermuteten hohen advektiven Transports von Methan im Zentrum von North Alex war die Sulfateindringung jedoch sehr hoch. Das könnte bedeuten, dass an dieser Stelle hohe Temperaturgradienten nicht zwingend auf hohe Flußraten schließen lassen, sondern durch Schlammextrusionen verursacht wurden.

Zum anderen zeigen die Verfügbarkeit von Methan und Sulfat im Vergleichskern, dass weder Elektronendonoren noch Elektronenakzeptoren limitierende Faktoren für die AOM-Aktivitäten darstellten und lassen somit den Vergleich der Ratenmessung zu den *in vitro* Experimenten zu.

Das Aktivitätsmaximum der SRR, von $\sim 200 \text{ nmol cm}^{-3} \text{ Tag}^{-1}$ deckt sich mit den durch Radiotracer-Messungen ermittelten Raten des entsprechenden oberflächennahen Sedimenthorizonts des Vergleichskerns (siehe Abb. 6). Die gleich hohen Raten sprechen dafür, dass es einen Sättigungsbereich für Methan in Bezug auf die AOM-Aktivitäten gibt, da die Verfügbarkeit von Methan im Vergleichskern, bedingt durch die Aktivität, höher sein müsste. Das deutet auch der Vergleich mit einer Studie (Omeregge *et al.*, 2009) an, in der ähnlich hohe AOM- und SR-Raten am North Alex gemessen wurden, der Schlammvulkan jedoch in einer Phase mit geringerer Aktivität war (Feseker *et al.*, 2009).

Die ermittelte Rate der methanabhängigen Sulfatreduktion liegt in der gleichen Größenordnung wie die SRR anderer aktiver submariner Schlammvulkane des Nil-Tiefseefächers, wie Amon, Isis, Chefren und Napoli (Omeregge *et al.*, 2009). Im Gegensatz zu anderen Schlammvulkanen im Golf von Cadiz oder Håkon Mosby in der Arktis liegt keine Limitierung durch die Verfügbarkeit des Elektronendonors Methan oder des Elektronenakzeptors Sulfat vor (Niemann *et al.*, 2006). Trotz der hohen Verfügbarkeit von Methan und Sulfat in den Sedimenten der Schlammvulkane des Nil-Tiefseefächers, sind die Prozessraten vergleichs-

weise gering. In anderen bekannten seep Systemen wie Hydrate Ridge (NE Pazifik) werden AOM- und SR-Raten von bis zu $100 \text{ mmol m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ gemessen (Treude *et al.*, 2003). Eine Erklärung für die geringeren Raten am NAMV könnte sein, dass die Sulfat-Methan-Übergangszone unterhalb der untersuchten Sedimenthorizonte liegt und die ermittelten Raten somit nicht das Maximum der AOM-Aktivitäten in diesem Habitat widerspiegeln.

Die Methananomalien in der Wassersäule überhalb des Meeresbodens am NAMV (Omoregie *et al.*, 2009) und die hohen gemessenen Sulfatkonzentrationen im Vergleichskern (unveröffentlichte Daten T. Treude) sprechen jedoch dagegen, da durch den Porenwasseraufstrom die Sulfatpenetration aus der Wassersäule in das Sediment behindert werden müsste.

4.2 Diversität mikrobieller Lebensgemeinschaften am NAMV

Zur Untersuchung der Diversität und Struktur mikrobieller Lebensgemeinschaften in Schlammvulkansedimenten von North Alex wurden 16S rDNA-Genbanken von Sedimenthorizonten der oberflächennahen oxischen Zone (0-1 cm), der Zone mit den höchsten gemessenen AOM- und SR-Raten (4-5 cm) und der tiefsten Zone des Kerns (29-31 cm) erstellt. In Kombination mit der Catalyzed reporter deposition Fluorescence *in situ* hybridization (CARD FISH) wurden einzelne Gruppen AOM-assoziiierter Mikroorganismen quantifiziert und vertikale Veränderungen analysiert. Im Folgenden werden die Ergebnisse im Hinblick auf verschiedene mögliche Stoffwechselprozesse am NAMV diskutiert.

Bakterielle Diversität am NAMV

In den Sedimenten von North Alex konnten 73-85 % aller bakterieller Sequenzen den δ -, γ - und ϵ -*Proteobacteria* zugeordnet werden. Damit ist die bakterielle Diversität im Vergleich zu anderen methanreichen Habitaten wie Sedimenten über Gashydraten (Knittel *et al.*, 2003) oder hydrothermalen Sedimenten des Guaymas Beckens (Teske *et al.*, 2002) als gering einzuschätzen. Jedoch ist das Ergebnis im Einklang mit früheren phylogenetischen Analysen von Schlammvulkanen des Nil-Tiefseefächers (Omoregie *et al.*, 2009) oder von Håkon Mosby (Lösekann *et al.*, 2006).

Die Hälfte aller Sequenzen des oberen und mittleren Sedimenthorizonts konnten den γ -*Proteobacteria* zugeordnet werden. Innerhalb dieser Klasse dominierten Vertreter der *Methylococcales*. Diese aeroben methanotrophen Bakterien können mit Methan als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle wachsen (Lidstrom, 2002) und treten in Sedimenten bevorzugt an oxisch/anoxischen Grenzschichten auf. Die hohen Abundanzen dieser Gruppe lässt eine Dominanz methanotro-

pher Bakterien im Lebensraum des North Alex MV vermuten. Diese Beobachtung legt nahe, dass trotz des anscheinend dominierenden methanverbrauchenden Prozesses der AOM, ein Teil des Methans, das bis an die Sedimentoberfläche gelangt von methanotrophen *γ-Proteobacteria* aerob oxidiert wird. Die Substratverfügbarkeit in den Sedimenten des Kraterzentrums beschränkt sich meist auf Methan und sedimentiertem organischen Kohlenstoff aus der Wassersäule. Der Eintrag aus der Wassersäule ist limitiert, da ein Großteil der Partikel bereits in der Wassersäule abgebaut wird, bevor er die Tiefsee erreicht. Methanotrophe Bakterien haben daher einen entscheidenden Selektionsvorteil gegenüber anderen Organismen in der Besiedlung dieses Lebensraums. Die Dominanz dieser Gruppe in der mittleren anoxischen Schicht könnte mit der Aktivität von North Alex und dem damit verbundenen Transport neuer Sedimente aus der Tiefe in Zusammenhang stehen. Eine andere Möglichkeit ist, dass sie durch Bioturbation benthischer Makrofauna in diese Sedimenttiefe gelangen. Andererseits ist die Ausbildung von Dauerstadien (Exosporen und Zysten) innerhalb dieser Bakteriengruppe weit verbreitet und die 16S rDNA-Analyse gibt zudem keine Auskunft über den Stoffwechselzustand der Zellen. Beispielsweise wurden an Schlammvulkansedimenten im Golf von Mexiko gezeigt, dass die Abundanz der *γ-Proteobacteria* in tieferen Schichten zunahm, die Aktivität der *in situ* Populationen sich aber umkehrt proportional verhielt (Martinez *et al.*, 2006).

Sulfatreduzierende Bakterien am North Alex MV

Sequenzen innerhalb der *δ-Proteobacteria* stellten den Großteil aller bakteriellen 16S rDNA-Sequenzen in Sedimenten von North Alex. Innerhalb dieser Klasse dominierten sulfatreduzierenden Bakterien der Familien *Desulfobacteraceae* (67 %) and *Desulfobulbaceae* (33%). Dies deckt sich mit den gemessenen SR-Raten in allen Sedimenthorizonten und bestätigt, dass die Reduktion von Sulfat ein wichtiger Prozess in dem Habitat ist. Kultivierte Vertreter der *Desulfobacteraceae* sind in der Lage eine Vielzahl von Elektronendonatoren vollständig zu CO₂ zu oxidieren, wodurch die Besiedlung anoxischer mariner Habitate erleichtert wird (z.B. Mußmann *et al.*, 2005, Leloup *et al.*, 2006).

Von den bereits bekannten AOM-assoziierten SRBs konnten nur 9 % der Sequenzen der Gattung *Desulfobulbus* zugeordnet werden, was in etwa den Hybridisierungssignalen dieser Gruppe (5 %) entsprach. In der der mittleren Sedimentschicht, d.h. aus dem Bereich mit den höchsten AOM-Aktivitäten, wurden *δ-Proteobacteria* nur in niedrigen Frequenzen (7 %) in der 16S rDNA-Genbank gefunden. Die typischen Seep-Sulfatreduzierer, die *Desulfosarcina*-verwandten (Knittel *et al.*, 2009) wurden in der 16S rDNA-Analyse gar nicht erfasst, *in situ* zeigte diese Gruppe jedoch große Abundanzen mit einer maximalen Detektionsrate von 34 % DAPI-gefärbter Zellen in der mittleren Sedimentschicht.

Diese Diskrepanz verdeutlicht, dass die ermittelte mikrobielle Zusammensetzung durch die kultivierungsunabhängige Methode der 16S rDNA-Analyse nicht zwingend die Abundanz im natürlichen Lebensraum widerspiegelt. Jeder Schritt der Methode ist durch unterschiedliche Fehlerquellen limitiert, die v.a. auf der unterschiedlichen Effizienz während der Zell-Lyse und Nukleinsäure-Extraktion und der selektiven Amplifikation der 16S rDNA-Gene während der PCR beruhen können (Venter *et al.*, 2004).

Sequenzen, mit Verwandtschaft zu sulfatreduzierenden Bakterien der Familie *Desulfobacteraceae* stellten nahezu die Gesamtheit aller bakteriellen 16S rDNA-Sequenzen im tiefsten Sedimenthorizont. In dieser Sedimenttiefe wurden Sulfatreduktionsraten von $\sim 50 \text{ nmol cm}^{-3} \text{ d}^{-1}$ bei Sulfatkonzentrationen um die 20 mM nachgewiesen (unveröffentlichte Daten T. Treude). Möglicherweise bewerkstelligen *Desulfobacteraceae* den Großteil des Sulfatumsatzes in dieser Sedimenttiefe. Vertreter der *Desulfosarcina/Desulfococcus*-Gruppe zeigten *in situ* keine hohe Abundanz in dieser Sedimenttiefe. Sequenzen mit hohen Frequenzen konnten den Gattungen *Desulfobacterium*, *Desulfobacula* und *Desulfatibacillum* zugeordnet werden. Interessanterweise, konnte für marine Vertreter dieser Gattungen gezeigt werden, dass sie aromatische Verbindungen wie Toloul oder höhere aliphatische Kohlenwasserstoffe oxidieren können (So & Young, 1999; Kuever *et al.*, 2001; Cravo-Laureau *et al.*, 2004). Dies deutet an, dass Mikroorganismen erdöhlaltige Bestandteile degradieren können die durch den Schlammvulkan nach oben transportiert werden. Probleme bei der DNA-Isolierung aus Sedimentproben dieser Tiefe und die Wahrnehmung eines starken Petroleumgeruchs ab einer Sedimenttiefe von 21 cm bei der Probennahme (persönliche Mitteilung T. Treude) stützen diese These.

Archaeelle Diversität am NAMV

Die archaeelle Diversität war in allen drei Schichten ähnlich gering wie die der Bakterien. Innerhalb des Phylums Euryarchaeota konnten vier, bei den Crenarchaeota nur zwei phylogenetische Gruppen identifiziert werden. Ein Großteil der Sequenzen ließ sich in Gruppen GOM Arc I (Euryarchaeota) und Marine Group I (Crenarchaeota) einordnen, wobei GOM Arc I die obere Sedimentschicht dominierte und Marine Group I den mittleren Sedimenthorizont. GOM Arc I konnte in methanreichen Sedimenten im Golf von Mexiko in großen Abundanzen detektiert werden (Lloyd *et al.*, 2006). Auf Grund von 16S rDNA Ähnlichkeiten wurde diese Gruppe ANME-2d genannt (Martinez *et al.*, 2005; Mills *et al.*, 2006), jedoch ist sie weder monophyletisch mit den anderen drei ANME-2 Untergruppen, noch konnte bisher gezeigt werden, dass sie Methan assimilieren oder Konsortien mit Sulfatreduzierern bilden. Die nächsten Verwandten dieser Gruppe sind unkultivierte Klone aus terrestrischen, methan-produzierenden Ökosystemen (Lloyd *et*

al., 2006), daher ist es möglich, dass diese Gruppe unkultivierte Methanogene repräsentieren.

Innerhalb der Crenarchaeota wurden Vertreter der Marine Group I und in niedrigen Abundanzen *Candidatus Nitrosopumilus* gefunden. Konneke *et al.* (2005) konnten innerhalb der Marine Group I den ersten chemolithoautotrophen Nitrifizierer innerhalb der Archaea identifizieren und isolieren (*Nitrosopumilaceae*). Diese Beobachtung deutet eine Kopplung von Methan-, Schwefel- und Stickstoffkreislauf in den Schlammvulkansedimenten an. Die Vorsilbe Nitroso- zeigt bei Nitrifizierern die Fähigkeit an, Ammonium zu Nitrit zu oxidieren. Die Ammoniumionen können von Diazotrophen zur Verfügung gestellt werden, die einzigen Organismen die imstande sind molekularen Stickstoff umzuwandeln. Als hoch konserviertes funktionelles Gen, kann *nifH* unter anderem für phylogenetische Studien genutzt werden. Das *nifH*-Gen (Dinitrogenasereduktase) kodiert eine Komponente des Schlüsselenzyms der Stickstofffixierung. In einer *nifH* nested-PCR mit DNA der mittleren Sedimentschicht wurde festgestellt, dass die meisten der *nifH*-Sequenzen in ein gemeinsames Cluster von Methanotrophen und Sulfatreduzierern fielen (Daten nicht gezeigt; mündliche Mitteilung C. Löscher). Es ist nicht davon auszugehen, dass dieses Ergebniss evolutionäre Beziehungen der Mikroorganismen untereinander widerspiegelt, da die Übertragung der Gene durch horizontalen Gentransfer möglich ist. Die molekularen Daten legen jedoch die Aufnahme des δ -proteobakteriellen *nifH*-Gens durch Methanotrophe nahe, da Methanogene einem anderen Cluster angehören. Der Nachweis von *nifH* Genen bedeutet allerdings nicht, daß aktive Stickstofffixierung stattfindet, jedoch konnten Dekas *et al.* (2009) unter Laborbedingungen bereits nachweisen, das anaerobe methanotrophe Archaeen (ANME-2) Stickstoff fixieren können und die daraus resultierenden Produkte mit Sulfatreduzierern (DSS) geteilt werden. Geht man davon aus, dass Stickstofffixierung und AOM auch am NAMV gekoppelt vorliegen, könnten die gefundenen Nitrifizierer die Ammoniumkonzentrationen im Sediment niedrig halten und so der Hemmung der Stickstofffixierung entgegen wirken.

In der 16S rDNA-Analyse konnten nur wenige Sequenzen (6,5 %) den bekannten Methanotrophen Archaeen zugeordnet werden. Die Sequenzen zeigten die größte Ähnlichkeit zu der ANME-2 Untergruppe 2a. Diese Untergruppe wurden schon in diversen methanreichen Sedimenten, wie z.B. Hydrate Ridge (Knittel *et al.*, 2004) identifiziert und bildet dort Konsortien mit *Desulfosarcina/Desulfococcus*. Die Quantifizierung mittels CARD FISH zeigte *in situ* ähnliche Abundanzen dieser Gruppe, mit einem Detektionsmaximum von 5 % in der tiefsten Sedimentschicht.

4.3 Konsortien am North Alex MV

In Sedimenten am North Alex wurden Gesamtzellzahlen von 10^{10} Zellen \times ml $^{-1}$ ermittelt. Im Vergleich dazu wurden in Zeiten geringer Aktivitäten des Schlammvulkans Gesamtzellzahlen von 10^9 Zellen \times ml $^{-1}$ festgestellt (Omoregie *et al.*, 2009).

Die Abundanz mikrobieller Aggregate unterschied sich signifikant in den untersuchten Sedimenttiefen. In der mittleren Sedimentschicht stellten Aggregate (Durchmesser 4-20 μ m), bestehend aus einem inneren Archaeen-Kern, umgeben von einer äußeren Schicht Bakterien, den Großteil der mikrobiellen Biomasse. Obwohl bekannte AOM-assoziierte Mikroorganismen wie ANME-2/-2a und *Desulfosarcina/Desulfococcus*- und *Desulfobulbus*-Verwandte detektiert wurden, bildeten sie keine Aggregate. In Anlehnung an die 16S rDNA-Analyse könnte der bakterielle Partner den *Proteobacteria* und der archaeelle Partner der Marine Group I oder GOM Arc I angehören. Unter dem Gesichtspunkt, dass in diesem Sedimenthorizont hohe AOM-Raten gemessen wurden, ist es eher vorstellbar dass GOM Arc I (ANME-2d) das unbekannte Archaeon in den Konsortien ist und würde damit einen Hinweis auf die Involierung von GOM Arc I in AOM liefern. Dies müsste jedoch mit dem Einsatz einer entsprechenden Sonde verifiziert werden.

Im tiefsten Sedimenthorizont (29-31 cm) wurden vereinzelt bakterielle und archaeelle Aggregate (10-15 μ M) gefunden. Ein besonderes Merkmal der Aggregate war die fehlende Vergesellschaftung von Bacteria und Archaea. Auch kleine Aggregate (< 5 μ M) von ANME-2 mit unbekanntem bakteriellem Partner konnten detektiert werden. Die gleiche Beobachtung machten auch Omoregie *et al.* (2009) am NAMV. Die 16S rDNA-Analyse lieferte Hinweise auf mögliche sulfatreduzierende Partner der δ -*Proteobacteria*. Dies verdeutlicht die Flexibilität der bakteriellen Partner in den AOM-Syntrophien. Aus Zeitgründen konnte der bakterielle Partner jedoch nicht identifiziert werden.

4.4 Quorum sensing mikrobieller Lebensgemeinschaften am NAMV

An Hand der Epifluoreszenzaufnahmen der gefundenen Aggregate von Bakterien und Archaeen bzw. anaeroben methanotrophen Archaeen (ANME-2) am NAMV konnte man deutlich sehen, dass die Zellen in einer Matrix eingebettet sind. Parsek & Greenberg (2005) konnten zeigen, dass die Ausscheidung von Exopolymersubstanzen, die zur Bildung von Mikrokolonien führen, durch *Quorum Sensing* gesteuert werden kann. Zwar ist bislang nicht bekannt, ob Archaeen *Quorum Sensing* zur Zell-Zell-Kommunikation nutzen, jedoch weiß man das gramnegative Bakterien, wie δ -*Proteobacteria* N-Acyl-Homoserin-Lactone

(AHL), mit verschiedenen Seitenkettenlängen und -substitutionen, für die innerartliche Kommunikation nutzen können. Zudem konnten aus heterogenen Bakterienmatten mit hohen Abundanzen von Archaeen und SRB diverse AHLs identifiziert werden (Decho *et al.*, 2009), was andeutet das verschiedene Bakterien über Artgrenzen hinweg mittels gleicher AHLs kommunizieren und so das Zellverhalten steuern könnten. Die schnelle Adaption AHL-abhängiger QS-Systeme in Anwesenheit neuer Bakterienpezies (Collins *et al.*, 2005) und die Verwendung mehrerer QS Systeme (Henke & Bassler, 2004) könnten die Entstehung von Konsortien in den Schlammvulkansedimenten erleichtern und zur Flexibilität der bakteriellen Partner in AOM-Syntrophien beitragen.

Zur Untersuchung in wieweit die mikrobiellen Lebensgemeinschaften in Sedimenten des NAMV durch das intraspezifische Signalmolekül AHL miteinander kommunizieren, wurde eine konstruierte Metagenombank des NAMV und Überstand aus den *in vitro* Inkubationen aktivitätsbasiert nach AHL-Signalmolekülen durchmustert. Für die Identifizierung dieser QS-Aktivitäten standen Reporterstämme zur Verfügung, die in der Lage sind kurzkettige, unsubstituierte AHL-Signalmoleküle (vor allem C6-HSL) oder 3-oxo-HSL nachzuweisen.

Auf diesem Wege konnten in einer MTP der Metagenombank ein AHL-Signal detektiert werden. Jedoch konnte das AHL-Signal nicht weiter verifiziert werden, da im Einzelklonmaßstab kein Nachweis des AHL-Signals mehr möglich war. Eine mögliche Ursache dafür, könnten zu niedrige Konzentrationen der AHL-Moleküle bei der Anzucht von Einzelklonen gewesen sein. Vorstellbar ist auch, dass mehrere Klone dieser Metagenombank AHLs produzieren und nur die Summe der AHL-Moleküle einen positiven Nachweis erbringen konnten. Um diesen Annahmen auf den Grund zu gehen, wurde die entsprechende MTP mit QS-Aktivität erneut dupliziert. Beim erneuten Test konnte das AHL-Signal nicht mehr bestätigt werden und somit das AHL-Signal nicht weiter verifiziert werden. Auf Grund der hohen Abundanzen archaeeller DNA in den Sedimenten am NAMV ist es denkbar, das die Fremd-DNA inkompatibel gegenüber dem verwendeten gramnegativen Wirtstamm *E. coli* war, was in einem Verlust des Inserts resultieren könnte. Zudem konnte festgestellt werden, dass nach der erneuten Duplikation, zwei Klone der MTP nicht mehr anwuchsen. Ein Erklärung könnte sein, dass die Genprodukte der transformierten DNA toxisch auf den Wirtstamm wirkten. Die verwendeten Biosensoren konnten lediglich eine kleine Bandbreite an AHL-Molekülen detektieren. Bedingt durch die chemischen Strukturunterschiede der N-Acyl-Seitenkette, konnte nicht das gesamte Repertoire der gramnegativen Signalmoleküle detektiert werden. Zudem wurden andere mögliche Formen der Kommunikation, mit Signalmolekülen wie AI-2, AI-3, Peptiden oder Metaboliten (Camilli & Bassler, 2006; Monds & O'Toole, 2008) nicht untersucht. Für die Detektion dieser Signalmoleküle standen keine adäquaten Reportersysteme zur Verfügung. Daher bietet die konstruierte Metagenombank Potential zur Identifikation weiterer QS-Systeme in den Sedimenten des NAMV.

4.5 Quorum quenching mikrobieller Lebensgemeinschaften am NAMV

Um weitere Einblicke in die chemische Interaktion der Konsortien zu erlangen, wurde die Metagenombank „NAMV“ im Hinblick auf QQ-Aktivitäten untersucht. Das Hauptaugenmerk bei der Durchmusterung galt QQ-Aktivitäten mit simultaner Interferenz gegenüber AHL und dem zwischenartlichen Signalmolekül AI-2.

Durch Verwendung entsprechender Reporterstämme, konnten Einzelklone der Metagenombank mit QQ-Aktivitäten gegenüber AHL und AI-2 identifiziert werden. Zur Einschränkung des dafür verantwortlichen DNA-Bereichs, wurde die inserierte DNA fragmentiert und subkloniert. Die zwei Subklone *E. coli* DH5a/pRS628 und *E. coli* DH5a/pRS629 wurden zur Identifizierung möglicher QQ-Gene vollständig sequenziert. Die Ergebnisse der Sequenzanalyse werden im Folgenden näher erläutert.

4.6 Mögliche QQ-Moleküle von *E. coli* DH5a/pRS628

Auf dem inserierten DNA-Fragment von *E. coli* DH5a/pRS628 kamen zwei offene Leseraster (ORF) als QQ-Gen in Frage. Der eine ORF zeigte die größte Ähnlichkeiten mit Bereichen des σ^{54} -abhängigen Transkriptionsregulators von *Candidatus Solibacter usitatus* Ellin6076. *Solibacter usitatus* ist ein Vertreter der *Acidobacteria*, die durch molekularbiologische Studien in zahlreichen Bodenhabitaten und Sedimenten gefunden wurden (Barns *et al.*, 1999; Liles *et al.*, 2003). Die Fähigkeit AHL zu degradieren, konnte für Vertreter dieses Phylums bereits gezeigt werden (Wang & Leadbetter, 2005). Auch alle weiteren Ergebnisse mit signifikanten Sequenzähnlichkeiten zeigten Proteine mit Interaktionsdomäne für σ^{54} . Die homologen Proteine stammten zum Großteil aus marinen, benthischen Organismen der δ -*Proteobacteria*, darunter auch Sulfatreduzierer, wie *Desulfobacterium* und *Desulfatibacillum*. Beide Gattungen konnten in hohen Abundanzen in der 16S rDNA-Analyse detektiert werden, und stellen potentielle bakterielle Partner der Konsortien von ANME-2 dar.

Auf Grund der erheblichen Struktur- und Größenunterschiede von σ^{54} und den Autoinducern kann nicht davon ausgegangen werden, dass die Bindedomäne des Proteins alternativ auch AHL/AI-2 binden könnte, was die Bindung der Autoinducer an den Promotor verhindern würde. Der detektierten QQ-Aktivität muß demnach ein anderer Wirkmechanismus zu Grunde liegen. Man weiß, dass in *E. coli*-Zellen annähernd 100 σ^{54} -Moleküle vorliegen (Jishage *et al.*, 2000) und das für die Aktivierung der σ^{54} -RNA Polymerase bei Stickstoffmangel diverse Aktivatoren benötigt werden (Shingler *et al.*, 1996).

Diese Aktivatoren haben den gemeinsamen Mechanismus der ATPase Aktivität,

was in der Initiation der Transkription resultiert (Wedel *et al.*, 1995). Auch der ORF scheint eine konservierte Domäne mit ATPase-Aktivität zu haben (AAA+ Superfamilie). Somit könnte ein möglicher QQ-Wirkmechanismus sein, dass durch die Anwesenheit eines σ^{54} -abhängigen Aktivators, Gene in *E. coli* transkribiert werden, die z.B zur Degradierung von den Autoinducern führen. Auch andere Studien deuten an, dass die Produkte die bei der Degradierung von AHL entstehen als N-Quelle genutzt werden können (z.B Yang *et al.*, 2006). Gegen diese Hypothese spricht jedoch, dass das Protein aus dem Überstand extrahiert wurde und somit extrazellulär vorliegt.

Das Zusammenspiel zwischen σ^{54} und QS-gesteuerten zellulären Prozessen konnte bereits für einige Organismen gezeigt werden. In *V. harveyi* steuert σ^{54} neben der Siderophore-Produktion und der Koloniemorphologie auch die Zelldichte-abhängige Regulation der Biolumineszenz (Lilley & Bassler, 2000). Bei niedriger Zelldichte bildet der alternative Sigma-Faktor σ^{54} zusammen mit dem phosphorylierten Antwortregulator LuxO einen Komplex, der in der Repression *lux*-abhängiger Gene resultiert (Tu und Bassler, 2007).

Auch da Silva Neto *et al.* (2008) konnten den negativen Einfluß von σ^{54} auf die Biofilmbildung bei dem γ -Proteobakterium *Xylella fastidiosa* zeigen. Die weite Verbreitung von σ^{54} in verschiedenen Mikroorganismen (Buck *et al.*, 2000), lässt die Schlussfolgerung zu, dass Aktivatoren mit Bindedomäne für σ^{54} in den Ursprungsorganismen wie *Desulfobacterium* oder *Desulfatibacillum Quorum sensing*-gesteuerten Prozesse mit regulieren. Jedoch kann auf Grund der Datenlage nicht gezeigt werden, dass dieser ORF die QQ-Aktivität vermittelt, somit sind mögliche QQ-Wirkmechanismen nur Spekulationen.

Der zweite identifizierte putative QQ-ORF von *E. coli* DH5 α /pRS628 zeigte die größte Übereinstimmung mit einer Vault Protein Inter-alpha-Trypsin Untereinheit aus *Syntrophobacter fumaroxidans MPOB*. Dieses sulfatreduzierende Bakterium lebt in Syntrophie mit dem methanogenen Archaeon *Methanospirillum hungateii*. Die Aminosäuresequenz weist zwei konservierte „vault protein inter-alpha-trypsin“ (VIT)-Domänen auf. VIT-Domänen sind bei Eukaryoten charakteristische Merkmale von Proteinen, die unter anderem eine Rolle bei der Stabilisierung der extrazellulären Matrix spielen. Die Stabilisierung der extrazellulären Matrix vollzieht sich durch kovalente Bindung der Proteine an Strukturkomponenten (z.B. Hyaluronsäure, Kollagene und Proteoglykane). Obwohl die Funktion bei Prokaryoten nicht geklärt ist, ist es denkbar, dass bakterielle Proteine mit diesen Domänen ebenfalls zur Stabilisierung der EPS beitragen, da diese Strukturkomponenten auch Bestandteile der bakteriellen EPS sein können.

Eine auf dem ORF kodierte Signalsequenz und die Tatsache, dass dieses Protein aus dem Überstand extrahiert wurde, deuten auf einen extrazellulären QQ-Wirkmechanismus hin. Möglicherweise vermittelt die VIT-Domäne eine kovalente Bindung an die Autoinducer und verhindert dadurch deren Promotorbindung. Die Tatsache, dass es aus einem in Syntrophie mit Methanogenen lebenden Sul-

fatreduzierer stammt, macht es als potentiell *QQ*-Protein für AOM-Konsortien interessant.

Allein basierend auf der Sequenzanalyse konnte der *QQ*-ORF nicht identifiziert werden. Möglicherweise werden auch beide ORFs für die Vermittlung von *QQ*-Aktivitäten benötigt. Weiterführende Untersuchungen zum *QQ*-Mechanismus sind nötig.

4.7 Identifikation des *QQ*-ORFs von *E. coli* DH5 α /pRS629

Durch Sequenzanalyse des inserierten DNA-Fragments von *E. coli* DH5 α /pRS629 wurde die potentielle Transkriptionseinheit *bcsBZ* aus *E. coli* str. K12 substr. MG 1655 und anderen *Enterobacteriaceae* identifiziert. Diese Gene sind Teil des Cellulosebiosynthese-Operons. Als extrazelluläres, von vielen Mikroorganismen gebildetes Stoffwechselprodukt ist die Synthese von Cellulose in ihren Eigenschaften ein Charakteristikum des *rdar* (red, dry and rough) Morphotyps. Im *rdar* Morphotyp besteht die extrazelluläre Matrix aus zwei Hauptkomponenten: Cellulose und Curli-Fimbrien. Aufgrund der Interaktion dieser beiden Komponenten halten die Bakterienaggregate fest zusammen und lassen sich nur schwer resuspendieren.

Die beiden ORFs (*bcsB* und *bcsZ*) des sequenzierten Inserts lagen 6 bp auseinander und machten zusammen >96 % des Inserts aus. Die ORF-flankierenden Sequenzen zeigten keine Übereinstimmung mit anderen Genen des Operons die für die Cellulose Biosynthese erforderlich sind.

BcsZ ist eine 41,7 kDa (369 As) große periplasmatische Cellulase. Endo-1,4- β -Glucanasen sind in der Lage Carboxymethylcellulose (CMC) zu hydrolysieren. Nichts deutete darauf hin, das AHL bzw. AI-2 alternative Substrate dieser Enzymklasse sein könnten. Es konnte davon ausgegangen werden, dass *BcsB* die *QQ*-Aktivität bedingt.

Das *bcsB*-Gen kodiert für ein bis-(3',5')-di-Guanosinmonophosphat (c-di-GMP) bindendes Protein, mit einem Molekulargewicht von 86 kD (779 AS), das in der Cytoplasma-Membran lokalisiert ist.

C-di-GMP ist als bakterielles intrazelluläres Signalmolekül in diversen Bakterienspezies an der Regulation einer Vielzahl unterschiedlicher Prozesse beteiligt. Auf Grund von partiellen Strukturähnlichkeiten zwischen c-di-GMP und den Autoinducern, wäre die Bindung der extrazellulären Signalmoleküle AHL und AI-2 vorstellbar. Durch Bindung der Signalmoleküle stehen diese Induktoren des QS-Wegs zur Verfügung.

Zur Bestätigung das dieser ORF die *QQ*-Aktivität tatsächlich bedingt, wurde das entsprechende Protein *QQ 1* überexpressiert und aufgereinigt. Die simultane Interferenz des Proteins *QQ 1* mit AHL und AI-2 wurde im Test mit den entsprechenden Reporterstämmen bestätigt. Zur weiteren Charakterisierung des Prote-

ins wurde der Einfluss auf das Schwärmverhalten bei *E. coli* K12 untersucht. *E. coli* K12 besitzt kein eigenes AI-1 System, verfügt aber genauso wie *Vibrio harveyi* über ein AI-2 Quorum Sensing-System (Surette & Bassler, 1998). Es wurde bereits gezeigt, dass halogenierte Furanone Biofilmbildung und Schwärmen in *E. coli* inhibieren (Ren *et al.*, 2001) und über Microarray-Analyse nachgewiesen, dass dies über die Inhibition des AI-2 Systems geschieht, indem unter anderem die Gene für Chemotaxis, Motilität und Flagellensynthese in Anwesenheit halogener Furanone inhibiert werden. Auch die Expression des QQ-Gens in *E. coli* BL21 (DE3) zeigte dass AI-2 gesteuertes Schwärmen um $\sim 80\%$ vermindert wurde, ohne dabei das Wachstum negativ zu beeinflussen.

Über den Wirkmechanismus des QQ-Proteins kann an dieser Stelle keine konkrete Aussage getroffen werden. Es liegt aber die Vermutung nahe, dass AHL und AI-2 durch Bindung an QQ 1 für die QS-Transkriptionsaktivierung nicht mehr zur Verfügung stehen. Zur Verifizierung dieser Aussage sind jedoch weitergehende Untersuchungen notwendig, um festzustellen, ob c-di-GMP-Bindeproteine eine solch weite Substratspezifität besitzen. Strukturanalysen von dem QQ-Protein inkubiert mit AHL-, AI-2- und c-di-GMP-Molekülen unter Verwendung der HPLC-MS-Analyse müssten folgen.

4.8 Ausblick

I. Zur Untersuchung der Methanemission am NAMV, müssten AOM-Raten im Rahmen einer Langzeitmessung ermittelt werden. Dabei wäre interessant, den Zusammenhang zwischen der Aktivität von North Alex und der Effizienz des mikrobiellen Filters zu analysieren. *In vitro* Experimente mit erhöhtem Methanpartialdruck könnten verifizieren ob es einen Sättigungsbereich von Methan für AOM gibt. Die phylogenetischen Analysen, deuten eine Kopplung von AOM und Stickstofffixierung am NAMV an. Radiotracer Experimente mit radioaktiv markiertem ^{15}N könnten diese Annahme verifizieren. Eine FISH-SIMS Analyse könnte den direkten Beweis für die Inkorporation von ^{15}N liefern.

II. Zur Identifizierung des archaellen Partners in den Bacteria/Archaea-Aggregate könnten in Anlehnung an die 16S rDNA-Analyse, Oligonukleotidsonden eingesetzt werden, die mit GoM Arc I und *Nitrosopumilaceae* hybridisieren. Durch die Verwendung drei verschiedener Tyramide könnte die Strukturanalyse der mikrobiellen Lebensgemeinschaften erweitert werden. Die detektierten Abundanzen der SRB könnten durch den Einsatz entsprechender Sonden bestätigt werden. Durch Doppelhybridisierung könnte überprüft werden, ob eine der Gruppen den unbekanntem bakteriellen Partner in den ANME-2-Aggregaten darstellt.

III. Um die *Quorum sensing* Mechanismen der mikrobiellen Lebensgemeinschaften am North Alex weiterführend zu studieren, könnte die angelegte Metagenombank mit Hilfe weiterer Biosensoren durchmustert werden. Durch Verwendung von *A. tumefaciens* als Biosensor könnte ein breiteres Spektrum an AHLs detektiert werden. Weiterführende Untersuchungen zur Detektion grampositiver Signalmoleküle oder des interspezies-spezifischen Signalmoleküls AI-2 wären interessant. Hiefür müssten entweder ebenfalls adäquate Reportersysteme entwickelt werden oder auf bereits bekannte Biosensoren, wie *Vibrio harveyi*, zur Detektion von AI-2, zurückgegriffen werden.

IV. Zur Identifizierung des QQ-Wirkmechanismus von *E. coli* DH5 α /pRS629 müssten die beiden putativen QQ-ORFs in einen Expressionsvektor inseriert und kloniert werden. Eine Aufreinigung der überexprimierten Proteine und der Nachweis mittels der Reporterstämme würden Aufschluss darüber geben, welcher ORF die QQ-Aktivität vermittelt.

V. Die Analyse aller identifizierten putativen QQ-ORFs in *in vivo* und *in vitro* Experimenten müsste folgen. So könnte die Expression der entsprechenden ORFs in *E. coli* den Einfluss der generierten Genprodukte auf das AI-2 gesteuerte Schwärmverhalten geben. Die Expression in *P. aeruginosa* könnte hingegen eine Interferenz mit AHL-basiertem Schwärmen suggerieren.

VI. Ein Einfluss der Expression der QQ-ORFs auf die AI-2 gesteuerte Biofilmbildung von *E. coli* könnte *in vivo* durch die Anzucht in Durchflusszellen gezeigt werden. Eine Veränderung der Biofilmstrukturen, wie Dicke, Biomasse und 3D-Struktur des Biofilms, wären ein Hinweis auf QQ-Aktivitäten. Diese Analysen könnten ebenso mit anderen Biofilmbildnern, wie z.B. *K. pneumoniae* oder *P. aeruginosa* durchgeführt werden.

VII. Die direkte Wirkung der QQ-Proteine auf die Biofilmbildung von Modellorganismen wie *E. coli*, *P. aeruginosa*, *B. subtilis* und *V. harveyi*, deren Biofilmbildung durch unterschiedliche QS-Systeme gesteuert ist, könnte in weiterführenden *in vitro* Experimenten beobachtet werden.

VIII. Zur Analyse des molekularen Wirkmechanismus der putativen QQ-Proteine müsste eine HPLC-MS-Analyse erfolgen. Dadurch könnte gezeigt werden, ob die Autoinducer durch die QQ-Proteine chemisch verändert werden oder die QQ-Aktivität, durch einen anderen Wirkmechanismus zu stande kommt.

5. LITERATURVERZEICHNIS

Barns, S. M., Takala, S. L., and Kuske, C. R. (1999). Wide Distribution and Diversity of Members of the Bacterial Kingdom Acidobacterium in the Environment. *Appl Environ Microbiol* **65**,1731-1737.

Barnes, R.O. & Goldberg, E.D. (1976), Methane production and consumption in anoxic marine sediments. *Geology* **4**:297-300

Bassler, B. L., Wright, M., Showalter, R. E., Silverman, M.R. (1993) Intercellular signalling in *Vibrio harveyi*: sequence and function of genes regulating expression of luminescence, *Mol. Microbiol.* **9**, 773–786.

Birnboim, H. C. & Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research* **7**, 1513-1523.

Boetius, A., Ravensschlag, K., Schubert, C.J., Rickert, D., Widdel, F., Gieseke, A., et al. (2000) A marine microbial consortium apparently mediating anaerobic oxidation of methane. *Nature* **407**: 623–626.

Boetius, A., Holler, T., Knittel, K., Felden, J., Wenzhöfer, F. (2008) The seabed as natural laboratory: lessons from uncultivated methanotrophs. **In Microbiol Monogr.** Berlin:Springer-Verlag. In press

Bohrmann, G. et al. (2003) Mud volcanoes and gas hydrates in the Black Sea: new data from Dvurechenskii and Odessa mud volcanoes. *Geo-Mar. Lett.* **23**, 239–249.

Camilli, A. & Bassler, BL. (2006) Bacterial small-molecule signaling pathways. *Science*, **311**:1113-1116.

Carlier, A., Uroz, S., Smadja, B., Fray, R., Latour, X., Dessaux, Y., Faure, D. (2003) The Ti plasmid of *Agrobacterium tumefaciens* harbors an *attM*-paralogous gene, *aiiB*, also encoding N-Acyl homoserine lactonase activity. *Applied and Environmental Microbiology* Vol. **69** No 8: 4989-4993.

Ceri, H., Olson, M. E., Stremick, C., Read, R. R., Morck, D. & Buret, A. (1999) The Calgary Biofilm Device: new technology for rapid determination of Antibiotic Susceptibilities of Bacterial Biofilms. *Journal of Clinical Microbiology microbiology* **37**, 1771-1776.

- Collins, C.H., Arnold, F.H., and Leadbetter, J.R. (2005)** Directed evolution of *Vibrio fischeri* LuxR for increased sensitivity to a broad spectrum of acyl-homoserine lactones. *Mol. Microbiol.* **55**: 712–723.
- 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.
- Curtis, T. P., Sloan, W. T. (2005)** Microbiology. Exploring microbial diversity – a vast below. *Science* Vol. **309** No 5739: 1331-1333.
- Dale, A.W., Regnier, P., Knab, N.J., Jørgensen, B.B., Van Cappellen, P. (2008)** Anaerobic oxidation of methane (AOM) in marine sediments from the Skagerrak (Denmark): II. Reaction-transport modeling. *Geochim. Cosmochim. Acta* **72**:2880–94
- Dale, A.W., Van Cappellen, P., Aguilera, D.R., Regnier, P. (2008)** Methane efflux from marine sediments in passive and active margins: estimations from bioenergetic reaction–transport simulations. *Earth Planet. Sci. Lett.* **265**:329–44
- Davies, D. G., Parsek, M. R., Pearson, J. P., Iglewski, B. H., Costerton, J. W., Greenberg E. P. (1998)** The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science* Vol. **280** No 5361: 295.
- d'Angelo-Picard, C., Faure, D., Penot, I., Dessaux, Y. (2005)** Diversity of N-acyl homoserine lactone-producing and -degrading bacteria in soil and tobacco rhizosphere. *Applied and Environmental Microbiology* Vol. **7** No **11**:1796-808.
- De Beer, D., E. Sauter, H. Niemann, U. Witte, M. Schlüter, and A. Boetius. (2006)** In situ fluxes and zonation of microbial activity in surface sediments of the Haakon Mosby Mud Volcano. *Limnol. Oceanogr.* **51**:1315–1331.
- Dong, Y.H., Zhang, X.F., Xu, J.L., Zhang, L.H. (2004)** Insecticidal *Bacillus thuringiensis* silences *Erwinia carotovora* virulence new form of microbial antagonism, signal interference. *Appl Environ Microbiol* **70**: 954–960.
- Eberhard, A. (1972)** Inhibition and activation of bacterial luciferase synthesis. *J Bacteriol* **109**: 1101–1105.

Eberl, L. (1999) N-Acyl Homoserinlactone-mediated gene Regulation in Gram-negative Bacteria. *Systematic and Applied Microbiology* **Vol. 22**: 493-506.

Elend, C., Schmeisser, C., Leggewie, C., Babiak, P., Carballeira, J. D., Steele, H. L., Reymond, J. L., Jaeger, K.-E., Streit, W. R. (2006) Isolation and biochemical characterization of two novel metagenome-derived esterases. *Applied and Environmental Microbiology* **Vol. 72 No 5**: 3637-3645.

Feseker, T., Pape, T., Wallmann, K., Klapp, S.A., Schmidt-Schierhorn, F., Bohrmann, G. (2009a) The thermal structure of Dvurechenskii mud volcano and its implications for gas hydrate stability and eruption dynamics. *Mar Petrol Geol* **26**:1812-1823.

Feseker, T., Dählmann, A., Foucher, J-P., Harmegnies, F. (2009b) In-situ sediment temperature measurements and geochemical porewater data suggest highly dynamic fluid flow at Isis mud volcano, eastern Mediterranean Sea. *Mar Geol* **261(1/4)**:128-137

Flemming, H. C. & Wingender, J. (2001) Relevance of microbial extracellular polymeric substances (EPSs)-Part II: Technical aspects. *Water Sci Technol* **43**, 9-16.

Fuqua, W.C., Winans, S.C. (1994) A LuxR-LuxI type regulatory activates *Agrobacterium* Ti plasmid conjugal transfer in the presence of a plant tumor metabolite. *J Bacteriol* **176**: 2796-2806.

Girguis, P.R., Cozen, A.E., DeLong, E.F. (2005) Growth and population dynamics of anaerobic methaneoxidizing archaea and sulfate-reducing bacteria in a continuous-flow bioreactor. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**:3725-33.

Givskov, M., de Nys, R., Manefield, M., Gram, L., Maximilien, R., Eberl, L., Molin, S., Steinberg, P. D. & Kjelleberg, S. (1996) Eukaryotic interference with homoserine lactone-mediated prokaryotic signalling. *Journal of bacteriology* **178**, 6618- 6622.

Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology* **Vol. 166 No 4**: 557-580.

Handelsman, J. (2004) Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms. *Microbiology and molecular biology reviews* **Vol.68 No 4**:686-691.

- Harrison, B.K., Zhang, H., Berelson, W., Orphan, V.J. (2009)** Variations in archaeal and bacterial diversity associated with the sulfate-methane transition zone in continental margin sediments (Santa Barbara , California). *Appl. Environ. Microbiol.* **75**:14 87–99.
- Henne, A., Schmitz, R. A., Bomeke, M., Gottschalk, G., and Daniel, R. (2000)** Screening of environmental DNA libraries for the presence of genes conferring lipolytic activity on *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* **66**, 3113-3116.
- Hensen C., Zabel M., Pfeiffer K., Schwenk T., Kasten S., Riedinger N., Schulz H., and Boetius A. (2003)** Control of sulfate pore-water profiles by sedimentary events and the significance of anaerobic oxidation of methane for the burial of sulfur in marine sediments. *Geochimica Et Cosmochimica Acta* **64(14)**, 2631-2647.
- Hentzer M., Riedel, K., Rasmussen, T., Heydorn, A., Andersen, J., Parssek M., Rice, S., Eberl, L., Molin, S., Høiby, N., Kjelleberg, S., Givskov, M. (2002):** Inhibition of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm bacteria by a halogenated furanone compound. *Microbiology* **Vol. 148**: 87-102.
- Hinrichs, K. U., Hayes, J. M., Sylva, S. P., Brewer, P. G. & DeLong, E. F. (1999)** Methane-consuming archaeobacteria in marine sediments. *Nature* **398**, 802-805.
- Hinrichs, K.U., and Boetius, A. (2002)** The anaerobic oxidation methane: new insights in microbial ecology and biogeochemistry. *In Ocean Margin Systems*. Wefer, G., Billett, Hebbeln, D., Jørgensen, B.B., Schlüter, M., and van Weering, T. (eds). *Heidelberg: Springer-Verlag*, 457–477.
- 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. *Glob. Biogeochem. Cycles* **8**, 451-463
- Hugenholtz, P., Tyson, G. W. (2008)** Metagenomics. *Nature* **Vol. 455 No 25**: 481-483.
- Hungate, R.E. (1967)** Hydrogen as an intermediate in the rumen fermentation. *Arch. Mikrobiol.* **59**:158-165.

Inagaki, F., M. M. M. Kuypers, U. Tsunogai, J. Ishibashi, K. Nakamura, T. Treude, S. Ohkubo, M. Nakaseama, K. Gena, H. Chiba, H. Hirayama, T. Nunoura, K. Takai, B. B. Jørgensen, K. Horikoshi, and A. Boetius. (2006) Microbial community in a sediment-hosted CO₂ lake of the southern Okinawa Trough hydrothermal system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**:14164–14169.

Inagaki, F., T. Nunoura, S. Nakagawa, A. Teske, M. Lever, A. M. Suzuki, K. Takai, M. Delwiche, F. S. Colwell, K. H. Nealson, K. Horikoshi, S. D'Hondt, and B. B. Jørgensen (2006). Biogeographical distribution and diversity of microbes in methane hydrate-bearing marine sediments on the Pacific Ocean Margin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**:2815–2820.

Iversen, N. and Blackburn, T.H. (1981) Seasonal rates of methane oxidation in anoxic marine sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **41**:1295–1300.

Iversen, N. and 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(5)**, 944–955.

Ishii, K., Mußmann, M., MacGregor, B.J. and Amann, R. (2004) An improved fluorescence in situ hybridization protocol for the identification of bacteria and archaea in marine sediments. *FEMS. Ecol.* **50**:203–212.

Joye, S. B., Boetius, A., Orcutt, B. N., Montoya, J. P., Schulz, H. N., Erickson, M. J., and Lugo, S. K. (2004) The anaerobic oxidation of methane and sulfate reduction in sediments from Gulf of Mexico cold seeps. *Chemical Geology* **205(3-4)**, 219–238.

Kawaguchi, T., Chen, Y.P., Norman, R.S., and Decho, A.W. (2008) Rapid screening of quorum sensing signal N-acyl homoserine lactones by an *in vitro* cell-free assay. *Appl Environ Microbiol* **74**: 3667–3671.

Knab, N.J., Dale, A.W., Lettmann, K., Fossing, H., Jørgensen, B.B. (2008) Thermodynamic and kinetic control on anaerobic oxidation of methane in marine sediments. *Geochim. Cosmochim. Acta* **72:37** 46–57.

Kaufmann, G.F., Sartorio, R., Lee, S.H., Rogers, C.J., Meijler, M.M., Moss, J.A., Clapham, B., Brogan, A.P., Dickerson, T.J., Janda, K.D. (2005) Revisiting quorum sensing: Discovery of additional chemical and biological functions for 3-oxo-Nacylhomoserine lactones. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**: 309–314.

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 above gas hydrate (Cascadia Margin, OR). *Geomicrobiol J* **20**:269–294.

Knietsch, A., Bowien, S., Whited, G., Gottschalk, G., and Daniel, R. (2003) Identification and characterization of coenzyme B12-dependent glycerol dehydratase- and diol dehydratase-encoding genes from metagenomic DNA libraries derived from enrichment cultures. *Appl Environ Microbiol* **69**, 3048-3060.

Knietsch, A., Waschowitz, T., Bowien, S., Henne, A., and Daniel, R. (2003) Construction and screening of metagenomic libraries from enrichment cultures: generation of a gene bank for genes conferring alcohol oxidoreductase activity on *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* **69**, 1408-1416.

Kopf, A. J. (2002) Significance of mud volcanism. *Rev. Geophys.* **B 40**, 1-49

Kopf, A.J. (2003) Global methane emission through mud volcanoes and its past and present impact on the Earth's climate. *Int J Earth Sci* **92**: 806–816.

Leloup, J., Loy, A., Knab, N. J., Borowski, C., Wagner, M., and Jørgensen, B.B. (2007) Diversity and abundance of sulfate-reducing microorganisms in the sulfate and methane zones of a marine sediment, Black Sea. *Environ. Microbiol.* **9**:131–42

Lidstrom, M.E. (2002). Aerobic Methylophilic Prokaryotes. In *The Prokaryotes* (Electronic version) Edited by M. Dworkin. New York: *Springer Verlag*.

Liles, M.R., Manske, B.F., Bintrim, S.B., Handelsman, J., and, R. M. (2003) A census of rRNA genes and linked genomic within a soil metagenomic library. *Appl Environ Microbiol* **69**, 2684-2691.

Loncke, L. et al. Mud volcanoes, gas chimneys, pockmarks and mounds in the Nile deep-sea fan (Eastern Mediterranean): geophysical evidences. *Marine Petrol. Geol.* **21**, 669-689 (2004).

Lloyd, K.G., Lapham, L., Teske, A. (2006) An anaerobic methane-oxidizing community of ANME-1b archaea in hypersaline Gulf of Mexico sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**:7218–30

Lösekan, 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.

Manefield, M., Rasmussen, T. B., Henzter, M., Andersen, J. B., Steinberg, P., Kjelleberg, S., Givskov, M. (2002): Halogenated furanones inhibit quorum sensing through accelerated LuxR turnover. *Microbiology Vol.* **148 No 4**: 1119-1127.

Martens, C.S. and R.A. Berner. (1977) Interstitial water chemistry of anoxic Long Island Sediment 1. Dissolved gases. *Limnol. Oceanogr.* **22**:10-25.

Martinez, R.J., Mills, H.J., Story, S., Sobecky, P.A. (2006) Prokaryotic diversity and metabolically active microbial populations in sediments from an active mud volcano in the Gulf of Mexico. *Environ. Microbiol.* **8:17** 83–96.

Mascle, J., Zitter, T., Bellaiche, G., Droz, L., Gaullier, V., Loncke, L., Prised Scientific Party (2001) The Nile deep sea fan: preliminary results from a swath bathymetry survey. *Mar Petrol Geol* **18**:471–477.

Milkov, A. V. (2000) Worldwide distribution of submarine mud volcanoes and associated gas hydrates. *Marine Geology* **167**, 29-42.

Milkov, A.V., Sassen, R., Apanasovich, T.V., Dadashev, F.G. (2003) Global gas flux from mud volcanoes: a significant source of fossil methane in the atmosphere and the ocean, *Geophys. Res. Lett.* **30** 1037

Milkov, A.V., Vogt, P.R., Crane, K., Lein, A.Y., Sassen, R., Cherkashev, G.A. (2004) Geological, geochemical, and microbial processes at the hydrate-bearing Håkon Mosby Mud Volcano: a review, *Chem. Geol.* **205** 347–366.

Miller M. B., Bassler, B. L. (2001) Quorum Sensing in Bacteria. *Annual Review of Microbiology* **Vol. 55**: 165-199.

Mills, H.J., Martinez, R.J., Story, S., Sobecky, P.A. (2005) Characterization of microbial community structure in Gulf of Mexico gas hydrates: comparative analysis of DNA- and RNA-derived clone libraries. *Appl. Environ. Microbiol.* **71:32** 25–47.

- Mußmann, M., Ishii, K., Rabus, R., and Amann, R. (2005)** Diversity and vertical distribution of cultured and uncultured *Deltaproteobacteria* in an intertidal mudflat of the Wadden Sea. *Environ Microbiol* **7**: 405–418.
- Nauhaus, K., Boetius, A., Krüger, M., Widdel, F. (2002)** In vitro demonstration of anaerobic oxidation of methane coupled to sulphate reduction in sediment from marine gas hydrate area. *Environ Microbiol* **4(5)**:298–305.
- 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, A., Boetius, and F. Widdel. (2007)** *In vitro* cell growth of marine archaeal-bacterial consortia during oxidation of methane with sulfate. *Environ. Microbiol.* **9**:187–196.
- Niemann H., Elvert M., Hovland M., Orcutt B., Judd A. G., Suck I., Gutt J., Joye S., Damm E., and Finster K. (2005)** Methane emission and consumption at a North Sea gas seep (Tommeliten area). *Biogeosciences* **2**, 335-351.
- Niemann H., Lösekann T., de Beer D., Elvert M., Nadalig T., Knittel K., Amann R., Sauter E. J., Schlüter M., Klages M., Foucher J. P., and Boetius A. (2006)** Novel microbial communities of the Haakon Mosby mud volcano and their role as a methane sink. *Nature* **443**, 854-858.
- Noguera, D. R., Pizarro, G., Stahl, D. A. Und Rittmann, B. E. (1999)** Simulation of multispecies biofilm development in three dimensions *Wat.Sci.Tech.* **39**, 123–130.
- Nuzzo, M., Hornibrook, E.R.C., Hensen, C., Parkes, R.J., Cragg, B.A., Rina, J., Schneider von Deimling, J., Sommer, S., Magalhães, V.H., Bruckmann, W., Pinheiro, L.M. (2008)** Shallow microbial recycling of deep-sourced carbon in Gulf of Cadiz mud volcanoes. *Geomicrobiol J* **25**:283–295.
- Omoregie, E.O., Mastalerz, V., de Lange, G., Straub, K.L., Kappler, A., et al. (2008)**. Biogeochemistry and community composition of iron- and sulfur-precipitating microbial mats at the Chefren Mud volcano (Nile Deep Sea Fan, Eastern Mediterranean). *Appl. Environ.Microbiol.* **74:3** 198–215.

Omoregie, E.O., Niemann, H., Mastalerz, V., de Lange, G.J., Stadnitskaia, A., Mascle, J., Foucher, J-P., Boetius, A. (2009) Microbial methane oxidation and sulfate reduction at cold seeps of the deep Eastern Mediterranean Sea. *Marine Geology*. **261** 114–127

Orcutt, B., Meile, C. (2008) Constraints on mechanisms and rates of anaerobic oxidation of methane by microbial consortia: process-based modeling of ANME-2 archaea and sulfate reducing bacteria interactions. *Biogeosciences* **5:15** 87–99.

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. *Environ. Microbiol.* **10:11** 08–17.

Orphan, V.J., House, C.H., Hinrichs, K.-U., McKeegan, K.D., DeLong, E.F. (2001) 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. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**:7663–68

Parsek, M. R. & Greenberg, E. P. (2005). Sociomicrobiology: the connections between quorum sensing and biofilms. *Trends in microbiology* **13**, 27-33.

Petrie, G. E. & Lupton, F. S. (1991). Performance characteristics of a low sludge bioreactor for wastewater treatment. *Waste Manag Res* **9**, 471-479.

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. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **105 (19)**, 7052–7057.

Purdy, K. J., D. B. Nedwell, T. M. Embley, Takii, S. (2001) Use of 16s rRNA-targeted oligonucleotide probes to investigate the distribution of sulphate-reducing bacteria in estuarine sediments. *FEMS Microbiology Ecology* **36**:165-168.

Ravenschlag, K., K. Sahm, J. Pernthaler, and R. Amann. (1999) High bacterial diversity in permanently cold marine sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:3982–3989.

Reeburgh, W.S. (2007) Oceanic methane biogeochemistry. *Chem Rev* **107**:486–513.

Reeburgh, W.S. (1976) Methan consumption in Cariaco Trench waters and sediments. *Earth Planet. Sci. Lett.* **15**:334-337.

Reitner, J., Peckmann, J., Blumenberg, M., Michaelis, W., Reimer, A., Thiel, V. (2005) Concretionary methaneseep carbonates and associated microbial communities in Black Sea sediments. *Palaeogeogr. Paleoclimatol. Paleocol.* **227**:18–30.

Ren, D., Bedzyk, L. A., Ye, R. W., Thomas, S. M., Wood, T. K. (2004) Differential gene expression shows natural brominated furanones interfere with the autoinducer-2 bacterial signaling system of *Escherichia coli*. *Biotechnology and Bioengineering*, **Vol. 88 No 5**: 630-642.

Ren, D., Bedzyk, L.A., Ye, R.W., Thomas, S.M., Wood, T.K. (2004) Stationary-Phase Quorum-Sensing Signals Affect Autoinducer-2 and Gene Expression in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology* **Vol. 70 No: 3** 2038–2043.

Ren, D., Sims, J. J., Wood, T. K. (2002) Inhibition of biofilm formation and swarming of *Bacillus subtilis* by (5Z)-4-bromo-5-(bromomethylene)-3-butyl-2-(5H)-furanone. *Letters in Applied Microbiology* **Vol. 34**: 293–299.

Sambrook, J., Fritsch, E., and Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning, a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, *Cold Spring Harbor*.

Schink, B. (1997) Energetics of syntrophic cooperation in methanogenic degradation. *Mol Microbiol Rev* **61**: 262-280.

Sibuet, M. & Olu, K. (1998) Biogeography, biodiversity and fluid dependence of deep-sea cold-seep communities at active and passive margins. *Deep-Sea Res. II* **45**,517–567.

Sørensen, K.B., Finster, K., and Ramsing, N.B. (2001) Thermodynamic and kinetic requirements in anaerobic methane oxidizing consortia exclude hydrogen, acetate and methanol as possible shuttles. *Microb Ecol* **42**: 1–10.

Steele, H. L., Jaeger, K.-E., Daniel, R., Streit, W. R. (2009) Advances in Recovery of Novel Biocatalysts from Metagenomes. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* **Vol.16**: 25-37.

- Steindler, L., Venturi, V. (2006)** Detection of quorum-sensing N-acyl homoserine lactone signal molecules by bacterial biosensors. *FEMS Microbiol Lett* **266**:1-9.
- Stewart, P. S. (2003)** Diffusion in biofilms. *J. Bacteriol.* **185**:1485–1491.
- Stewart, P. S. (2003)** New ways to stop biofilm infections. *Lancet* **361**, 97.
- Streit, W. R., and Schmitz, R. A. (2004)** Metagenomics - the key to the uncultured microbes. *Curr Opin Microbiol* **7**, 492-498.
- Strunk, O., Gross, O., Reichel, B., May, M., Hermann, S., Stuckman, N., Nonhoff, B., Lenke, M., Ginhart, A., Vilbig, A., T., Bode, A., Schleifer, K.-H. & Ludwig, W. (1998)** ARB: a software environment for sequence data. <http://www.mikro.biologie.tu-muenchen.de>. Department of Microbiology Technische Universität München, Munich, Germany.
- Teske, A., Hinrichs, K.-U., Edgcomb, V., Gomez, A.D.V., Kysela, D., Sylva, D., et al. (2002)** Microbial diversity of hydrothermal sediments in the Guyamas Basin: evidence for anaerobic methanotrophic communities. *Appl Environ Microbiol* **68**: 1994–2007.
- Tu, K. C., Waters, C. M., Svenningsen, S. L., Bassler, B. L. (2008)** A small-RNA-mediated negative feedback loop controls quorum-sensing dynamics in *Vibrio harveyi*. *Molecular microbiology* **Vol. 70 No 4**:896-907.
- Trehu, A., Bohrmann, G., Rack, F. and 47 others (2004)**. Drilling gas hydrate on Hydrate Ridge, Cascadia Continental Margin. Ocean Drilling Program, Leg 204 (preliminary report), Texas A & M University, College Station, TX.
- Treude T., Boetius A., Knittel K., Wallmann K., and Jørgensen B. B. (2003)** Anaerobic oxidation of methane above gas hydrates at Hydrate Ridge, NE Pacific Ocean. *Marine Ecology- Progress Series* **264**, 1-14.
- Valentine, D.L. (2000)** Biogeochemistry of Hydrogen and Methane in Anoxic Environments: Thermodynamic and Isotopic Studies. PhD Thesis, *Earth System Science*, University of California at Irvine, pp. 173.
- Vendeville, A., Winzer, K., Heurlier, K., Tang, C. M., Hardie, K. R. (2005)** Making 'sense' of metabolism: autoinducer-2, LuxS and pathogenic bacteria. *Nat. Rev. Microbiol* **3**:383–396

- Venter, J. C., Remington, K., Heidelberg, J. F. & other authors (2004).** Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. *Science* **304**, 66-74.
- Voget, S., Leggewie, C., Uesbeck, A., Raasch, C., Jaeger, K.-E., Streit, W. R. (2003)** Prospecting for novel biocatalysts in a soil metagenome. *Applied and Environmental Microbiology* **Vol. 69 No 10**: 62 35-42.
- von Wintzingerode, F., Gobel, U. B. & Stackebrandt, E. (1997)** Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. *FEMS Microbiol Rev* **21**,213-229.
- Wellsbury, P., K. Goodman, B. Cragg, and R. Parkes. (2000).** The geomicrobiology of deep marine sediments from Blake Ridge containing methane hydrate (sites 994, 995, and 997). *Proc. Ocean Drill. Prog. Sci. Results* **164**: 379-391.
- Widdel, F., Boetius, A., Rabus, A. (2006)** Anaerobic biodegradation of hydrocarbons including methane, p. 1028-1049. In M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer, and E. Stackebrandt (ed.), *The prokaryotes*, **vol. 2**. Springer-Verlag, New York, NY.
- Widdel, F., and Bak, F. (1992)** Gram-negative mesophilic sulfate-reducing bacteria. In *The Prokaryotes*. Balows, A., Trüper, H.G., Dworkin, M., Harder, W., and Schleifer, K.-H. (eds). New York: *Springer*, 3352-3378.
- Williams, P. (2007)** Quorum sensing, communication and cross-kingdom signaling in the bacterial world. *Microbiology* **153**: 3923-3938.
- Williams, P., Winzer, K., Chan, W., Camara, M. (2007)** Look who's talking: communication and quorum sensing in the bacterial world. *Philos Trans R Soc London B Biol Sci* **362**: 1119-1134.
- Williamson, L. L., Borlee, B. R., Schloss, P. D., Guan, C., Allen, H. K., Handelsman, J. (2005)** Intracellular Screen To Identify Metagenomic Clones That Induce or Inhibit a Quorum-Sensing Biosensor. *Applied and Environmental Microbiology* **Vol. 71 No 10**: 6335-6344.
- Yang, W.W., Han, J.I., Leadbetter, J.R. (2006)** Utilization of homoserine lactone as a sole source of carbon and energy by soil *Arthrobacter* and *Burkholderia* species. *Arch Microbiol* **185**: 47-54.

Zehnder, A. J. B. & Brock, T. D. (1979) Methane formation and methane oxidation by methanogenic bacteria. *J. Bacteriol.* **137**, 420-432.

Zhang, H.B., Wang, L.H., Zhang, L.H. (2002) Genetic control of quorum-sensing signal turnover in *Agrobacterium tumefaciens*. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 4638-4643.

Hensen, C., Wallmann, K., Schmidt, M., Ranero, C.R., und Suess, E. (2003) Fluid expulsion related to mud extrusion off Costa Rica-A window to the subducting slab. *Geology* **32**:201-204.

Matthews, E. (2000) Wetlands. In: Khalil, M.A.K. (Hg.) Atmospheric Methane: Its Role in the Global Environment. Springer Verlag, 202-233.

Judd, A. & Hovland, M. (2007) Seabed fluid flow. The impact on geology, biology and the marine environment. Cambridge University Press, Cambridge.

Knittel, K., Lösekann, T., Boetius, A., Kort, R., Amann, R. (2005) Diversity and distribution of methanotrophic archaea at cold seeps. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**:467-79.

Knittel, K. & Boetius, A. (2009) Anaerobic Oxidation of Methane: Progress withan Unknown Process. *Annu. Rev. Microbiol.* **63**:311-34.

M. Strous, M. S. M. Jetten (2004) Anaerobic oxidation of methane and ammonium. *Annu. Rev. Microbiol.* **58**, 99.

Oligonukleotide für CARD FISH

Probe	Specificity	Penetration for CARD-FISH*	FA-conc. (%)	Probe Sequence (5'-3')	Reference
ANME-2-S3B	ANME-2, family ANME-A, <i>Methanohalobium thurstonii</i> , <i>Methanocaldococcus jensenii</i>	0.5% SDS for 10 min RT†	40-45	GGC TAC CAC TGG GGC CGC	Thraule et al. (2016)
ARCH 1915	<i>Archaea</i>	10 mg/ml lysozyme for 60 min, 60 U/ml achromoperoxidase for 30 min, 37°C	35	GTC CTC CCC GGC CAA TTC CT	Isari et al. (2004)
ELB33B (ELB33B II)	Mixed Bacteria	10 mg/ml lysozyme at 37°C for 60 min	35	GCT GGC TCC DGT AGG AGT	Antoni et al. (1990)
ELB33BP (ELB33B II)	Bacteria including <i>Flavobacterium</i>	10 mg/ml lysozyme at 37°C for 60 min	35	BGA GCC ACG CGT AGG TGT	Dallins et al. (1999)
ELB33BY (ELB33B III)	Bacteria including <i>Yersinia enterocolitica</i> spp.	10 mg/ml lysozyme at 37°C for 60 min	35	GCT GGC ACC CGT AGG TGT	Dallins et al. (1999)
DSS 65B	<i>Desulfosarcina</i> <i>Desulfosarcina</i> (including ANME-2 partners)	10 mg/ml lysozyme at 37°C for 15 min	50	TCC ACT TCC CTC TCC CAT	Manz et al. (1990)
DBB 65D	<i>Desulfobacterales</i>	10 mg/ml lysozyme at 37°C for 15 min	60	GAA TTC CAC TTT CCC CTC TG	Devesa et al. (1992)

* given conditions were optimized for marine sediments and subsurface soils; for other samples protocol needs to be re-evaluated

† if necessary 15 mg/ml penicillin K, 2 min at RT can be used for all ANME groups. However, ANME-2 and -3 cells are more sensitive to penicillin K and should be slightly damaged while ANME-1 cells are more robust and require a further protocol.

FA-conc.: Formaldehyde concentration in CARD-FISH hybridization buffer

Pen-conc.: Quaternary cationic concentration in CARD-FISH wash buffer

RT: Room temperature

DANKSAGUNG

Mein erstes Dankeschön möchte ich an meine beiden Professoren, Ruth Schmitz-Streit und Tina Treude, richten - für das Vertrauen, die Förderung und die große Diskussionsbereitschaft bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Die Mitarbeiter beider Arbeitsgruppen haben mir, durch den Zusammenhalt und die große Hilfsbereitschaft, die Diplomzeit so angenehm wie möglich gestaltet.

Ein besonderer Dank geht an Nancy - deine Kompetenz und deine Präsenz haben meine Erwartungen bei weitem übertroffen.

Am IFM-GEOMAR möchte ich mich ganz besonders bei meinem Geologiementor und Freund Tomas Feseker bedanken. Aber ebenso möchte ich Warner Brückmann, für die Bereitstellung von Videomaterialien und Wolfgang Queisser für die technische Unterstützung danken.

Ein herzlicher Dank geht auch an Katrin Knittel vom MPI in Bremen für die großartige Unterstützung bei CARD FISH und der 16S rDNA-Analyse.

Weiterhin danke ich den Mitarbeitern am IPÖ, für die Nutzung zahlreicher Gerätschaften und die nette Atmosphäre.

Bei meiner Familie, meinen Freunden und meinen Diplomgeschwistern möchte ich mich fürs Mittragen und Ertragen bedanken - ich machs wieder gut! Besonders hervorzuheben ist Pia, die mir vor allem in der letzte Phase der Diplomarbeit eine große Stütze war.

Zu guter Letzt möchte ich diese Gelegenheit nutzen, um Peter Linke für sein Verständnis und seine außergewöhnliche Unterstützung während der ganzen Studienzeit von ganzem Herzen zu danken.

ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Diplomarbeit mit dem Titel „Funktionelle Analysen der mikrobiellen Gemeinschaft in Sedimenten von marinen Schlammvulkanen“ selbständig unter Anleitung meiner akademischen Lehrer angefertigt habe. Ich habe keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet.

Kiel, den 27.02.2010

VERÖFFENTLICHUNG:

Die vorliegende Arbeit darf erst nach Absprache mit Frau Prof. Dr. R. A. Schmitz-Streit zur Veröffentlichung bereit gestellt werden.