

AUS DEM  
LEIBNIZ-INSTITUT FÜR MEERESWISSENSCHAFTEN

**PROKARYOTISCHE AKTIVITÄT UND DIVERSITÄT  
AN MARINEN BIO-GEO-SCHNITTSTELLEN IN DER TIEFSEE  
UNTER BESONDERER BERÜCKSICHTIGUNG DER  
PROZESSE DER METHANOXYDATION**

**DISSERTATION**

ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES  
DER MATHEMATISCH-NATURWISSENSCHAFTLICHEN FAKULTÄT  
DER CHRISTIAN-ALBRECHTS-UNIVERSITÄT  
ZU KIEL

VORGELEGT VON  
BJÖRN WEITZEL

KIEL 2004

Referent : Prof. Dr. J. F. Imhoff

Korreferent : Prof. Dr. P. Schönheit

Tag der mündlichen Prüfung : 06. Juli 2004

Zum Druck genehmigt : Kiel, .....

---

Der Dekan

*Meinen Eltern*



*Das Schöne tut seine Wirkung schon bei der bloßen Betrachtung,  
das Wahre will Studium.*

FRIEDRICH VON SCHILLER

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden vorab in den Jahresberichten des Instituts für Meereskunde, in Berichten an die Projektträger sowie als Tagungsbeiträge veröffentlicht.

# Inhaltsverzeichnis

Einleitung .....	1
1    „Oasen in der Wüste der Tiefsee“ .....	1
2    Stand der Forschung und Zielsetzung.....	3
2.1    Methan.....	5
2.2    Gashydrate .....	6
2.3    Mikrobielle Methanoxidation .....	8
2.3.1    Aerobe Methanoxidation .....	8
2.3.2    Anaerobe Methanoxidation .....	9
3    Geologische und geochemische Grundlagen sowie Charakterisierung der beprobten Standorte .....	11
3.1    Plattentektonik .....	11
3.2    Hydrothermalismus .....	13
3.2.1    Das Nord-Fiji-Becken .....	14
3.2.2    Die Bransfield Straße.....	16
3.3    Gashydrat-Lager und Gas-Seeps .....	17
3.3.1    Der Makran-Akkretionskeil .....	18
Material und Methoden .....	21
4    Probennahme.....	21
4.1    Wasserproben .....	21
4.2    Sedimentproben .....	21
5    Physikalische und chemische Parameter .....	23
5.1    Temperatur, Salzgehalt und pH-Wert.....	23
5.2    Schwefel-Verbindungen .....	23
5.3    Nitrat .....	23
5.4    Gelöster anorganischer Kohlenstoff.....	24
5.5    Methan.....	24

6	<i>Mikrobiologische Parameter</i> .....	25
6.1	Gesamtbakterienzahl und mittleres Biovolumen.....	25
6.2	Bakterielle Sekundärproduktion.....	25
6.3	Methan-Oxidation und -Inkorporation.....	26
6.3.1	<i>Methode</i> .....	26
6.3.2	<i>Durchführung</i> .....	26
6.3.3	<i>Bestimmung der zugesetzten Aktivität</i> .....	27
6.3.4	<i>Berechnung der Raten</i> .....	28
6.4	CO <sub>2</sub> -Fixierung.....	29
7	<i>Mikrobielle Diversität</i> .....	30
7.1	Rasterelektronenmikroskopie.....	30
7.2	Isolierung methanotropher Bakterien.....	30
7.3	Molekularbiologische Analysen.....	31
7.3.1	<i>Bearbeitung der Proben</i> .....	31
7.3.2	<i>DNA-Extraktion</i> .....	31
7.3.2.1	Freeze-Thaw Technik.....	31
7.3.2.2	CTAB-Methode.....	32
7.3.2.3	QIAamp DNA Mini Kit.....	33
7.3.3	<i>Polymerase Kettenreaktion</i> .....	34
7.3.3.1	Standard-Amplifikation von 16S rDNA.....	34
7.3.3.2	Reamplifikation klonierter DNA.....	35
7.3.3.3	Amplifikation von funktionellen Genabschnitten.....	37
7.3.3.4	Erstellung von 16S rDNA - Amplifikaten für die DGGE.....	38
7.3.3.5	Reamplifikation von DGGE-Banden.....	40
7.3.4	<i>Agarose Gel Elektrophorese</i> .....	41
7.3.5	<i>Denaturierende Gradienten Gel Elektrophorese (DGGE)</i> .....	41
7.3.6	<i>Klonierung</i> .....	44
7.3.7	<i>Sequenzierung</i> .....	45
7.4	Phylogenetische Analysen.....	48
7.4.1	<i>Datenbankvergleich</i> .....	48
7.4.2	<i>Phylogenetische Berechnungen</i> .....	48

Ergebnisse.....	49
8 <i>Mikrobiologische und geochemische Untersuchungen           in Hydrothermalfeldern des Nord-Fiji-Beckens</i> .....	49
8.1   Physikalische, chemische und mikrobiologische Parameter .....	49
8.1.1 <i>Wassersäule</i> .....	49
8.1.2 <i>Bodennahe Wasserkörper</i> .....	53
8.2   Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen.....	56
8.3   Molekularbiologische und phylogenetische Analysen.....	58
8.3.1 <i>DGGE-Diversitätsmuster</i> .....	58
8.3.2 <i>Bakterielle Diversität in Klonbibliotheken</i> .....	60
8.4   Makrofauna und bakterielle Symbionten.....	64
9 <i>Mikrobiologische und geochemische Untersuchungen in Cold Seeps           des Makran-Akkretionskeils vor der Küste Pakistans</i> .....	65
9.1   Chemische und mikrobiologische Parameter .....	65
9.2   Isolierung und Identifizierung methanotropher Bakterien .....	66
10 <i>Diversität und Aktivität von Prokaryoten-Gemeinschaften           in den Sedimenten der Bransfield Straße (Antarktis)</i> .....	71
10.1   Physikalische und chemische Parameter.....	72
10.2   Mikrobiologische Parameter .....	72
10.3   Diversität der Archaea-Gemeinschaften .....	74
Diskussion .....	81
11 <i>Mikrobiologische und geochemische Untersuchungen           in Hydrothermalfeldern des Nord-Fiji-Beckens</i> .....	81
11.1   Bakterielle Aktivität in hydrothermal beeinflussten Bereichen der Wassersäule .....	81
11.1.1 <i>Hydrothermal Plumes</i> .....	81
11.1.2 <i>Hydrothermale Gradienten</i> .....	82
11.2   Bakterielle Diversität in hydrothermal beeinflussten Wasserkörpern .....	82
11.2.1 <i>Unterschiede zum umgebenden Tiefenwasser</i> .....	82
11.2.2 <i>Unterschiede zwischen verschiedenen hydrothermal                           beeinflussten Wasserkörpern</i> .....	83

11.2.3	<i>Vergleich mit anderen Hydrothermalstandorten.....</i>	86
12	<i>Mikrobiologische und geochemische Untersuchungen in Cold Seeps des Makran-Akkretionskeils vor der Küste Pakistans .....</i>	89
12.1	Hinweise auf eine bisher unbekannte Gattung von methanotrophen Bakterien .....	89
13	<i>Diversität und Aktivität von Prokaryoten-Gemeinschaften in den Sedimenten der Bransfield Straße (Antarktis).....</i>	91
13.1	Mikrobielle Aktivitäten in hydrothermal beeinflussten, anoxischen Sedimenten.....	91
13.2	Prokaryotische Diversität im Hinblick auf potentiell an der anaeroben Methanoxidation beteiligte Gruppen.....	93
13.2.1	<i>Archaea .....</i>	93
13.2.2	<i>Eubakterien und Sulfatreduzierer .....</i>	95
14	<i>Synthese .....</i>	96
15	<i>Kritische Betrachtungen zu den Methoden und Ergebnissen.....</i>	97
15.1	Bestimmung mikrobieller Aktivitäten .....	97
15.2	Molekularbiologische Diversitätsanalysen .....	97
Literatur .....		101
Anhang.....		115
16	<i>Medien .....</i>	115
16.1	Mineralmedien zur Anreicherung und Isolierung methanotropher Bakterien.....	115
16.2	Im Rahmen der Klonierungsexperimente verwendete Medien .....	117
17	<i>Puffer.....</i>	118
18	<i>Denaturierungslösungen für die DGGE.....</i>	119
19	<i>Ergebnisse der Datenbankvergleiche .....</i>	120
19.1	Klonierungsexperimente Nord-Fiji-Becken (Bakterien).....	121
19.2	Klonierungsexperimente Bransfield Straße (Archaea) .....	127



## Abkürzungen

16S rDNA	Für die 16S rRNA codierender DNA-Abschnitt
Abb.	Abbildung
AMS	Ammonium-Mineralsalz
ANMS	Ammonium/Nitrat-Mineralsalz
aSOB	Autotrophe Schwefel-oxidierende Bakterien
CTAB	Hexadecyltrimethylammoniumbromid
ddNTPs	Didesoxyribonucleosidtriphosphate
DGGE	Denaturierende Gradienten Gel-Elektrophorese
DNA	Deoxyribonucleic acid
dNTPs	Desoxyribonucleosidtriphosphate
et al.	und weitere Autoren
Fa.	Firma
GC	Guanin und Cytosin
HBS	Hydro Bottom Station
hSOB	Heterotrophe Schwefel-oxidierende Bakterien
Kap.	Kapitel
KWS	Kranzwasserschöpfer
MS	Multisonde
MSR	Most stable region
NMS	Nitrat-Mineralsalz
PCR	Polymerase chain reaction
pMMO	Partikuläre Methan-Monooxygenase
<i>pmoA</i>	Für die pMMO codierender Genabschnitt
REM	Rasterelektronenmikroskopisch(e)
rRNA	Ribosomal ribonucleic acid
S.	Seite

Fortsetzung auf der nächsten Seite

### Fortsetzung Verzeichnis der Abkürzungen

s.	Siehe
s.o.	Siehe oben
s.u.	Siehe unten
sMMO	Freie Methan-Monooxygenase
sp.	Species
SRB	Sulfat-reduzierende Bakterien
Tab.	Tabelle
u.a.	Unter anderem
vergl.	Vergleiche



---

## *Kurzfassung*

An den submarinen Kontinentalrändern sind im Zuge tektonischer Prozesse besondere Tiefseelebensräume entstanden. In Bereichen mit hydrothermalen Aktivität werden geothermisch energiereiche Verbindungen synthetisiert und in die Wassersäule abgegeben. Anderenorts führen Hebungs Vorgänge dazu, daß zuvor in Gashydraten geologisch fixierte Energieträger freigesetzt werden. An diesen Bio-Geo-Schnittstellen ist die Fähigkeit bestimmter Prokaryoten, die auf diese Weise zur Verfügung gestellten Substanzen für ihren Stoffwechsel zu nutzen, die Entwicklungsgrundlage für ungewöhnlich produktive Tiefseegemeinschaften.

Im Rahmen mehrerer Forschungsprojekte wurden die Aktivität und Diversität von an solchen Standorten lebenden Prokaryoten-Gemeinschaften untersucht. Von besonderem Interesse waren hierbei die für die biologische Methanoxidation verantwortlichen Gruppen.

An Hydrothermalquellen im zentralen Nord-Fiji-Becken (Süd-West Pazifik) wurden Wasserkörper mit unterschiedlichen Anteilen an hydrothermalen Fluiden untersucht. Es zeigte sich, daß mit zunehmender Distanz zur Quelle und der damit zunehmenden Verarmung an reduzierten Verbindungen Diversitätsänderungen in den Bakteriengemeinschaften einhergehen. Hierbei wird eine Vent-typische Gemeinschaft, mit signifikanten Anteilen an chemolithotrophen Vertretern, von einer eher pelagisch geprägten, chemoorganotrophen Bakteriengemeinschaft abgelöst.

In den Quellbereichen haben insbesondere Schwefel-oxidierende Bakterien großen Anteil am Aufbau organischer Biomasse. Sie leben größtenteils in Symbiose mit bestimmten Muschel- und Schneckenarten und nutzen dabei die primär durch geochemische Prozesse entstehenden, reduzierten Schwefelverbindungen als Energiequelle. Trotz ausreichend hoher Methankonzentrationen konnte hier ein mikrobieller Umsatz von Methan nicht nachgewiesen werden, genausowenig wie die Anwesenheit bekannter methanotropher Bakteriengruppen.

Aus den Oberflächen-Sedimenten von Cold Seeps, die durch Gashydratlager im Makran-Akkretionskeil (Arabisches Meer) gespeist wurden, konnten hingegen erfolgreich aerobe Methanoxidierer isoliert werden. Unter den Isolaten befindet sich auch eine bisher unbekannte Gattung von Methylococcaceen, die aufgrund ihrer phänotypischen Merkmale und auch auf der Basis ihrer phylogenetisch relevanten Erbinformation von den bisher bekannten methanotrophen Bakteriengattungen unterschieden werden kann.

---

Im anoxischen, hydrothermal beeinflussten Sediment am Rand einer Vulkanstruktur in der Bransfield Straße (Antarktis) wurden mit molekularbiologischen Methoden mehrere, ebenfalls bisher unbekannte Gruppen von Archaea entdeckt. Die Konzentration der Vertreter eines bestimmten Klon-Clusters auf den Sedimenthorizont mit den höchsten Methan-Oxidationsraten kann als Hinweis darauf gewertet werden, daß zumindest ein Teil der hier zusammengefaßten Euryarchaeota am anaeroben Methanumsatz beteiligt ist. Die Oxidation von Methan unter anaeroben Bedingungen erfolgt nach derzeitigem Kenntnisstand durch Konsortien aus methanogenen Archaea und Sulfat-reduzierenden Bakterien, die am Standort ebenfalls in signifikanten Anzahlen vertreten waren.

---

## *Abstract*

Special deep-sea environments have emerged during tectonic processes at the submarine continental margins. In areas with hydrothermal activity energetic compounds are synthesized and released into the water column. At other sites uplifting of the seafloor leads to the discharge of energy sources that were formerly fixed in gas hydrates. At these bio-geo-interfaces the ability of prokaryotes to metabolize the available substances is the basis for the development of unusually productive deep-sea communities.

The activity and diversity of such prokaryotic communities in these kinds of environments were investigated during several research projects. Of special interest were the groups responsible for the biological oxidation of methane.

Water-bodies with different portions of hydrothermal fluids were examined at hydrothermal vents in the central North Fiji Basin (South-West Pacific). It appeared that changes within the bacterial community structure could be observed with increasing distance from the vent sites and decreasing concentrations of reduced compounds. Over these distances typical vent-communities, with significant portions of chemolithotrophic species, are replaced by chemoorganotrophic communities with pelagical characteristics.

In the hydrothermal vent fields, sulfur-oxidizing bacteria take a major part in building up organic biomass. They use reduced sulfur compounds, mainly originating from geochemical processes, as an energy source. Most thiotrophic bacteria live in symbiosis with specialized mussels and gastropods. In spite of sufficient amounts of methane in the water, microbial oxidation of methane could not be detected and no known groups of methanotrophic bacteria could be found.

In contrast to this, aerobic methane-oxidizing bacteria could be isolated successfully from the surface of cold seep sediments in the Makran accretionary prism. Here, the gas seeps are fueled by destabilized gas hydrate bearings. Among the derived isolates there are representatives of a, thus far, unknown genus belonging to the Methylococcaceae. According to their phenotypic and genotypic characteristics these bacteria are different from previously described methanotrophic genera.

Anoxic, hydrothermally-influenced sediments were investigated at the edge of a volcanic structure in the Bransfield Strait (Antarctica). Groups of previously unknown archaea were detected in different sediment horizons using molecular biological methods. The accumulation of clones from a certain cluster in the sediment horizon with the highest methane oxidation rates indicates that some of

---

the euryarchaeota in this cluster take part in the anaerobic oxidation of methane. According to recent studies the methane oxidation in anoxic environments is mediated by consortia of methanogenic archaea and sulfate-reducing bacteria. Significant numbers of the latter were found in the investigated sediments.

# Einleitung

## 1 „Oasen in der Wüste der Tiefsee“

Die Weiten der Tiefsee, die auch in der Gegenwart nur zu einem geringen Anteil erforscht sind, gelten noch immer als „Wüsten“ der Ozeane. Da in diese Tiefen kein Sonnenlicht mehr vordringen kann, sind insbesondere die hier lebenden benthischen Organismen als Lebensgrundlage auf das organische Material angewiesen, was aus der euphotischen Zone zu ihnen herabsinkt. Handelt es sich nicht gerade um Meeresregionen mit außergewöhnlich hoher Produktivität (z.B. Auftriebsgebiete) ist dieser Eintrag jedoch sehr gering (JANNASCH AND TAYLOR 1984). In Folge dessen sind in diesem Lebensraum die Individuendichten in allen Gliedern der Nahrungskette im Regelfall auch entsprechend niedrig. Doch wie in allen Wüsten gibt es auch in der Tiefsee „Oasen“: Als das Tauchboot *Alvin* im Januar 1977 eine submarine Spreizungszone nordöstlich der Galápagos Inseln untersuchte, stieß es dort am Meeresboden auf heiße Quellen, in deren Umgebung sich eine ungewöhnlich üppige Makrofauna angesiedelt hatte (JANNASCH 1986).

Nachfolgende Untersuchungen ergaben, daß die Produktion chemotropher Prokaryoten die Grundlage für das reiche Leben an diesen Bio-Geo-Schnittstellen bildet (JANNASCH AND WIRSEN 1979, KARL et al. 1980, RUBY et al. 1981). Diese Mikroorganismen sind in der Lage, die Energie für ihren Stoffwechsel aus der Oxidation der in den austretenden Fluiden gelösten reduzierten Verbindungen (Schwefelwasserstoff, Methan, Wasserstoff und reduzierte Metall-Ionen) zu gewinnen. Als Kohlenstoffquellen dienen ihnen  $\text{CO}_2$  (chemoautotrophe Produzenten), Methan oder andere einfache organische Verbindungen, die im Zuge der hydrothermalen Prozesse freigesetzt werden (KARL 1995, MCCOLLOM AND SHOCK 1997). Die als Aufwuchs oder frei im Wasser lebenden chemotrophen Prokaryoten bilden wiederum die Nahrungsgrundlage für andere Organismen. Einige spezialisierte Bakterienarten leben in Symbiose mit niederen Tieren, die ihrerseits Räubern und Aasfressern als Nahrung dienen (CHILDRESS et al. 1991). Diese Organismengemeinschaft ist somit weitestgehend unabhängig vom Input durch photosynthetische (photoautotrophe) Produktion und hat sich im Laufe der Jahrtausende der eigentlich eher lebensfeindlichen Umgebung in eindrucksvoller Weise angepaßt (JANNASCH 1985).

Die Bedingungen an diesen Hydrothermalquellen ähneln nach Meinung vieler Wissenschaftler denen, die zu Zeiten der Erdgeschichte geherrscht haben, als seismische und vulkanische Aktivitäten in den Meeren und auf dem Festland allgegenwärtig waren und sich zur Photosynthese befähigte Organismen noch nicht

entwickelt hatten (MCCOLLOM AND SHOCK 1997, TESKE et al. 2003). Andere meinen sogar, aus den an Hydrothermalstandorten ablaufenden Prozessen Informationen darüber ableiten zu können, wie einfaches Leben auf anderen Planeten aussehen könnte (WEISS et al. 2000, TRENT 2000). Von kommerziellem Interesse wiederum sind Stoffe und Stoffwechselfvorgänge, die die Resistenzen der Vent - Organismen gegen Hitze, niedrige pH-Werte sowie toxische Schwefel- und Metallverbindungen bedingen (RAGUENES et al. 1996, CANGANELLA et al. 1997, LLANOS et al. 2000). Nicht zuletzt sehen es einige Forscher als wahrscheinlich an, daß die Hydrothermalquellen der Tiefsee auch die letzten Refugien sein könnten, die noch existieren, wenn das übrige Leben auf unserer Erde schon in weiten Teilen zum Erliegen gekommen ist (JANNASCH 1986, VAN DOVER et al. 2002).

Es gibt also vielfältige Gründe, die die Wissenschaft dazu bewegen, sich speziell mit diesem Lebensraum auseinanderzusetzen, auch wenn seine Produktionsleistung vorsichtigen Schätzungen zufolge nur 0,02% der in den Ozeanen auf Photosynthesebasis betriebenen Produktion entspricht (MCCOLLOM AND SHOCK 1997). Diese niedrigen Zahlen mögen zum einen dadurch bedingt sein, daß aufgrund des hohen technischen Aufwands erst wenige submarine Hydrothermalstandorte intensiv untersucht werden konnten. Zum anderen konzentrierten sich die meisten bisherigen Arbeiten auf die augenscheinlicheren Manifestationen hydrothermalen Aktivität, d.h. Standorte an denen weithin sichtbare dunkle Wolken aus teilweise meterhohen Schloten am Meeresboden austreten (DESBRUYÈRES et al. 2000). Weniger Beachtung dagegen fanden Hydrothermalfelder mit niedrigeren Temperaturen, eher diffusen Fluidaustritten, obwohl diese weit verbreitet und aus biologischer Sicht von größerer Bedeutung sind (TUNNICLIFFE 1991). Außerdem ist an solchen warmen Quellen Methan, neben reduzierten Schwefelverbindungen, häufiger die nächstwichtigste Energiequelle für die Chemosynthese; anders als an Hoch-Temperatur-Emissionen, wo meist molekularer Wasserstoff die größere Rolle spielt (JANNASCH AND MOTTL 1985). Unsere Untersuchungen im Rahmen der Projekte HYFIFLUX II und HYDROARC richteten sich daher gezielt auf Hydrothermalstandorte mit relativ großflächigen Nieder-Temperatur-Emissionen.

#### HYFIFLUX II:

„Mikrobiologische und geochemische Untersuchungen  
in Hydrothermalfeldern des Nord-Fiji-Beckens“

#### HYDROARC:

„Diversität und Aktivität autotropher Bakteriengemeinschaften  
in den Sedimenten der Bransfield Straße (Antarktis)“

## 2 Stand der Forschung und Zielsetzung

Bei den frühen Expeditionen zu Hydrothermalstandorten im *Nord-Fiji-Becken*, die sich auch mit mikrobiologischen Aspekten befaßten, waren zunächst Anomalien in der Wassersäule untersucht worden, die sich von dem umgebenden Wasser durch erhöhte Mangankonzentrationen abhoben. In diesem Zusammenhang wurden bakterielle Lebendzellzahlen erfaßt, mit Hilfe selektiver Medien thioautotrophe Bakterien isoliert und im Hinblick auf ihre physiologischen Eigenschaften untersucht (NAGANUMA et al. 1989, NAGANUMA AND SEKI 1994). Im Jahre 1991 wurden dann mit dem Tauchboot Shinkai 6500 verschiedene aktive Fluidaustritte direkt beprobt und die Standorte in Bezug auf Bakterienzahlen und -Produktion miteinander verglichen (UTSUMI et al. 1994). Zwar gibt es basierend auf Kultivierungsexperimenten auch Schätzungen über die Anteile thioautotropher Bakterien an den in hydrothermal beeinflussten Bereichen lebenden Bakteriengemeinschaften (NAGANUMA AND SEKI 1994, UTSUMI et al. 1994), detaillierte Untersuchungen zur bakteriellen Diversität wurden bisher jedoch noch nicht durchgeführt. Ebenso existieren bislang noch keine direkten Messungen der bakteriellen Aktivität an diesen Standorten.

Nachdem bereits Ende der 80iger Jahre erste geologische und geochemische Hinweise auf hydrothermale Aktivität in der *Bransfield Straße* gefunden wurden (SUESS et al. 1987, SCHLOSSER et al. 1988), entdeckten BOHRMANN et al. (1999) im Rahmen der SCOTIA FLUX I Antarktis-Expedition (Nov.1997 - Jan.1998) in der Nähe des flachmarinen Vulkanbaus Hook Ridge ein aktives Hydrothermalfeld. Hier wurden auch an mehreren Stationen erhöhte Methan-Konzentrationen im unteren Bereich der Wassersäule gemessen. Obwohl man bei der Beprobung der Sedimente Pogonophoren-Arten fand, von denen bekannt ist, daß sie bakterielle Endosymbionten tragen, wurden mikrobiologische Aspekte bei der bisherigen Erforschung des submarinen Hydrothermalismus in diesem Meeresgebiet noch nicht betrachtet.

Bei den beiden Forschungsreisen im Rahmen der Projekte HYFIFLUX II und HYDROARC handelte es sich also, soweit es die Mikrobiologie betraf, um Explorationsfahrten, auf denen zum ersten Mal versucht werden sollte, Aktivität und Struktur der Gemeinschaften in diesen beiden hydrothermal beeinflussten Lebensräumen genauer zu erfassen und mit geochemischen Standortparametern zu korrelieren.

Der Schwerpunkt meiner Untersuchungen lag hierbei auf der Bestimmung der mikrobiellen Methanoxidation und der Analyse der Diversität der an diesem Prozeß beteiligten Prokaryoten. In diesem Zusammenhang wurden zusätzlich Proben von durch Gashydrat-Lager gespeisten „Methan-Seeps“ im *Makran-Akkretionskeil* vor der Küste Pakistans bearbeitet (VON RAD et al. 2000).

#### MAKRAN II:

#### „Mikrobiologische und geochemische Untersuchungen in Cold Seeps des Makran-Akkretionskeils“

Die bisher einzigen mikrobiologischen Untersuchungen in diesem Meeresgebiet wurden ebenfalls von Mitgliedern der eigenen Arbeitsgruppe durchgeführt und konzentrierten sich auf Schwefel-oxidierende Vertreter der Gattung *Thioploca* (SCHMALJOHANN et al. 2001).

## 2.1 *Methan*

Methan ist eine (unter Normaldruck und bei Temperaturen oberhalb von  $-164^{\circ}\text{C}$ ) gasförmige, brennbare organische Verbindung. Im Methanmolekül ist ein zentrales Kohlenstoffatom ( $\text{C}_1$ -Verbindung) kovalent an vier in einem regelmäßigen Tetraeder angeordnete Wasserstoffatome gebunden. Methan gehört damit zur Gruppe der Kohlenwasserstoffe (CHRISTEN 1984).

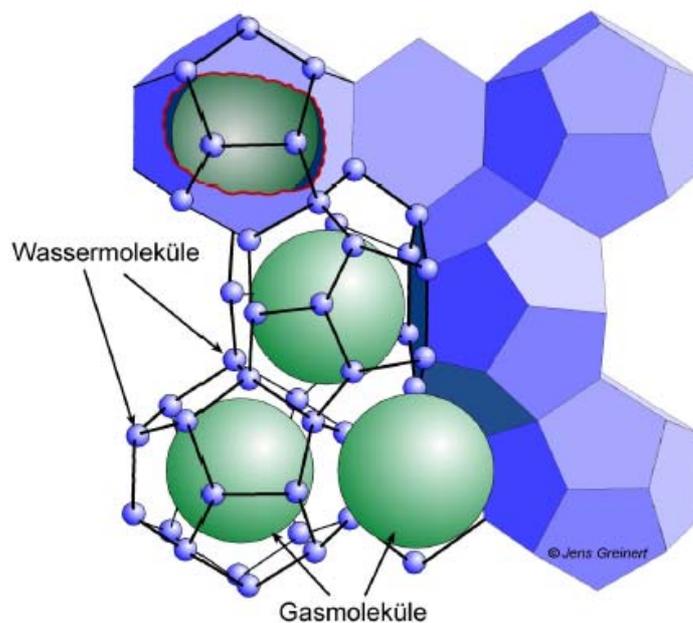
Es wird in der Regel beim anaeroben mikrobiellen Abbau organischer Substanz gebildet (biogenes Methan). Hierbei wird das organische Material an anoxischen Standorten zunächst über mehrere Zwischenstufen zu Actetat, Kohlendioxid und molekularem Wasserstoff vergoren. Im letzten Schritt des biologischen Abbaus bilden dann bestimmte Gruppen anaerober Archaea (Methanogene) aus diesen Produkten Methan (SCHLEGEL 1992, MADIGAN et al. 2001).

Unter den besonderen Bedingungen, wie sie im Untergrund heißer Hydrothermalsysteme herrschen, kann es jedoch auch zu einer abiogenen Methanbildung kommen (abiogenes Methan, s. Kap. 3.2, S.13). Insofern stünden die Methanverwertenden Prokaryoten hier aus ökologischer Sicht auf einer Stufe mit den chemolithoautotrophen Produzenten. Aufgrund der hohen biologischen Produktivität an vielen Hydrothermal-Standorten kommen jedoch noch weitere Quellen für das hier nachweisbare Methan hinzu: Dies ist zum einen die einfache thermische Zersetzung von organischem Material (thermogenes Methan, HORITA UND BERNDT 1999) und zum anderen die biogene Methanogenese in anoxischen Nischen. Welchen Anteil diese unterschiedlichen Quellen an der Methanbildung haben, hängt von Alter und Intensität des Fluidaustritts sowie den geologischen Gegebenheiten und der Besiedelung des jeweiligen Hydrothermalstandortes ab.

Obwohl ein großer Teil des hier freigesetzten Methans bereits in den unmittelbar beeinflussten Wasserkörpern biologisch oxidiert wird, ist submarine hydrothermale Aktivität grundsätzlich eine bedeutende Quelle für Methan in den Ozeanen. (WELHAN AND CRAIG 1979, DE ANGELIS et al. 1993).

## 2.2 Gashydrate

Gashydrate sind feste, kristalline Strukturen, die sich bei niedrigen Temperaturen und hohem Druck aus einer Mischung von Gas und Wasser bilden. Hierbei werden Gasmoleküle unterschiedlicher Größe in einem Käfig aus Wassermolekülen eingeschlossen (Abb. 1). Daher werden diese eisähnlichen Verbindungen auch als Clathrate (lat.: clatratus = Käfig) bezeichnet. Wie bei der Eisbildung werden auch bei der Hydratgenese Salze ausgeschlossen, so daß die Hydratgitter weitestgehend aus reinem Süßwasser bestehen.



**Abbildung 1.** Gashydratstruktur (nach SUESS et al. 1999).

Etwa 90 Prozent der natürlich vorkommenden Gashydrate enthalten Methan als zentrales Molekül, das zu einem großen Anteil aus dem fermentativen Abbau von organischer Substanz stammt. Der größte Teil der Hydratvorkommen liegt deshalb in den Ozeanen im Bereich der Kontinentalränder, wo die Sedimentationsraten an organischem Material entsprechend hoch sind. Bei ausreichend hoher Gaskonzentration ist dort die Hydratgenese ab einer Tiefe von 500 m und einer Umgebungstemperatur von 5°C möglich. Treten dabei noch Schwefelwasserstoff und Kohlendioxid hinzu, so vergrößert sich das Stabilitätsfeld und die Hydrate können auch in geringerer Tiefe und/oder bei höheren Temperaturen stabil bleiben.

---

Gashydrate sind in den letzten Jahren als potentiell nutzbare Energieträger und als möglicher Klimafaktor in den Blickpunkt der marinen Forschung und Technik gerückt. Heutige Schätzungen gehen davon aus, daß 54% des weltweit vorhandenen Kohlenstoffes in Gashydraten fixiert sind. Eine Destabilisierung größerer Teile dieser Reservoirs im Zuge der globalen Erwärmung hätte entsprechend schwerwiegende Konsequenzen. Durch Gashydrat-Einlagerungen verfestigte Kontinentallänge würden nach deren Auflösung abrutschen und riesige Flutwellen (Tsunamis) auslösen. Nicht weniger kritisch ist die Tatsache, daß das auch an anderen Stellen freiwerdende Methan ein wesentlich höheres Treibhauspotential besitzt als Kohlendioxid. Da Gashydrate schon bei geringfügigen Temperaturerhöhungen destabilisiert werden, könnte eine entsprechende Erwärmung des Ozeans in den relevanten Gebieten einen sich selbst verstärkenden Prozeß in Gang setzen, der zu gravierenden Klimaveränderungen in der Erdatmosphäre führen würde (KENNETT 2002).

## 2.3 Mikrobielle Methanoxidation

### 2.3.1 Aerobe Methanoxidation

Die biologische Oxidation von Methan im aeroben Milieu erfolgt überwiegend durch methanotrophe Bakterien. Diese sind in der Lage, mit Methan als alleiniger Kohlenstoff- und Energiequelle zu wachsen (HANSON AND HANSON 1996). Bei allen bisher isolierten methanotrophen Bakterien handelt es sich um strikt aerobe, Gram-negative Eubakterien, die sich auf einfachen Mineralmedien in einer mit Methan angereicherten Atmosphäre kultivieren lassen. Die Methanotrophen und ihr Stoffwechsel sind schon länger Gegenstand mikrobiologischer Untersuchungen (WHITTENBURY et al. 1970). Ihre phylogenetischen Beziehungen wurden jedoch in den letzten Jahren auf der Basis neuer molekulargenetischer Untersuchungsmethoden wiederholt revidiert (BOWMAN et al. 1991, BOWMAN et al. 1993, BOWMAN et al. 1995).

Anhand ihrer physiologischen und morphologischen Eigenschaften unterscheidet man heute im wesentlichen 6 Haupt-Gattungen, die ihrerseits in drei Großgruppen eingeteilt werden (MURRELL AND HOLMES 1995):

Die Typ I Methanotrophen, mit den Gattungen *Methylomonas*, *Methylobacter* und *Methylomicrobium*, gehören zu den Gammaproteobakterien. Diese Bakterien enthalten intracytoplasmatische Membranstapel und assimilieren das Stoffwechselintermediat Formaldehyd auf dem Ribulose-Monophosphat-Weg (RuMP). Die Typ II Methanotrophen, mit den Gattungen *Methylosinus* und *Methylocystis*, werden den Alphaproteobakterien zugeordnet. Ihre intracytoplasmatischen Membranen sind entlang der Zellperipherie angeordnet und die Formaldehyd-Fixierung erfolgt auf dem Serin-Weg. Bei der dritten Gruppe, den sogenannten Typ X Methanotrophen, mit der Gattung *Methylococcus*, handelt es sich ebenfalls um Gammaproteobakterien. In Bezug auf ihre anderen Merkmale weisen sie jedoch sowohl Charakteristika von Typ I als auch von Typ II Methanotrophen auf (Tab. 1).

Mit *Methylococcus* verwandt ist die Gattung *Methylcaldum* (BODROSSY et al. 1997). Die Wachstums-Optima der beschriebenen *Methylcaldum*-Arten liegen wie auch bei *Methylococcus capsulatus* mit über 40°C in Temperatur-Bereichen, wie sie auch innerhalb hydrothermalen Gradienten auftreten. Anders als *Methylococcus* verfügt *Methylcaldum* jedoch nicht über eine freie Methan-Monooxygenase (s. S. 9) und kann Formaldehyd sowohl auf dem RuMP- als auch auf dem Serin-Weg fixieren.

Bei den bisher von Hydrothermalstandorten isolierten Methan-oxidierenden Bakterien handelt es sich ihrer phänotypischen Charakterisierung zu Folge um Typ I Methanotrophe (JANNASCH AND TAYLOR 1984, JANNASCH AND MOTTL 1985). Auch die bekannten methanotrophen Endosymbionten gehören zu diesem Typ (DISTEL AND CAVANAUGH 1994, POND et al. 1998).

**Tabelle 1.** Charakteristika aerober Methan-oxidierender Bakterien  
(verändert nach MURREL AND HOLMES 1995)

(Membran-) Typ:	Typ I		Typ II
Gruppe:	Gammaproteobacteria		Alphaproteobacteria
Formaldehyd-Fixierung:	Ribulosemonophosphat-Weg		Serin-Weg
Gattungen:	<i>Methylobacter</i> <i>Methylomicrobium</i> <i>Methylomonas</i>	<i>Methylococcus</i>	<i>Methylosinus</i> <i>Methylocystis</i>
Enzym-Typen:	pMMO	pMMO & sMMO	

Der erste Schritt im aeroben Prozeß der bakteriellen Methanoxidation wird durch das Enzym Methan-Monooxygenase katalysiert. Alle Methanotrophen verfügen über eine membrangebundene partikuläre Methan-Monooxygenase (particulate methane monooxygenase = pMMO) für deren Funktion ausreichende Konzentrationen an Kupfer von essentieller Bedeutung sind. Nur Typ II Methanotrophe und *Methylococcus*-Arten können bei Kupfer-Limitation eine freie (lösliche) Methan-Monooxygenase (soluble methane monooxygenase = sMMO) exprimieren, die ihnen das Wachstum auch unter diesen Bedingungen ermöglicht (MURRELL AND HOLMES 1995).

### 2.3.2 Anaerobe Methanoxidation

Die biologische Oxidation von Methan unter anaeroben Bedingungen wird nach heutigem Kenntnisstand von mikrobiellen Konsortien geleistet. In dieser syntrophen Gemeinschaft leben revers arbeitende methanogene Archaea zusammen mit Sulfat-reduzierenden Bakterien (SRB). Die eigentliche Methanoxidation, bei der die Archaea das Methan mit Wasser zu CO<sub>2</sub> und Wasserstoff umsetzen, wird dadurch

angetrieben, daß der dabei entstehende Wasserstoff von Sulfatreduzierern sofort zur Umsetzung von Sulfat zu Sulfid und Wasser verwendet wird. Somit ist das chemische Gleichgewicht zu Ungunsten der unter anderen Bedingungen stattfindenden Methanogenese verschoben (DELONG 2000).

Nachdem Geochemiker und Mikrobiologen schon früher, aufgrund gegenläufiger Profile der Sulfat- und Methankonzentrationen in anoxischen marinen Sedimenten, eine räumliche Koppelung von Methanoxidation und Sulfatreduktion postuliert hatten (IVERSEN AND JØRGENSEN 1985, HOEHLER et al. 1994), gelang im Jahr 2000 (BOETIUS et al. 2000) zum ersten Mal der optische Nachweis von Konsortien der für diese Prozesse verantwortlichen Mikroorganismen. In Sedimentproben vom Hydrate Ridge vor Oregon wurden mit Hilfe fluoreszenzmarkierter gruppenspezifischer Sonden kugelförmige Aggregate sichtbar gemacht, in denen durchschnittlich 100 coccoide Archaea von ca. 200 ebenfalls coccoiden Sulfat-reduzierenden Bakterien umgeben waren. Ähnlich strukturierte Konsortien in Verbindung mit der anaeroben Oxidation von Methan wurden in der Folgezeit an anderen Standorten gefunden (ORPHAN et al. 2001, ORPHAN et al. 2002).

Da sich die an der anaeroben Methanoxidation beteiligten Organismen bis zum jetzigen Zeitpunkt noch einer Kultivierung entziehen, wurde der Beweis, daß tatsächlich den methanogenen Archaea nahestehende Gruppen am anaeroben Methanumsatz beteiligt sind, bislang nur indirekt geführt. Dieser beruht auf der Erkenntnis, daß die biologische Oxidation von Methan mit einer Isotopenfraktionierung einhergeht, bei der das leichtere Isotop  $^{12}\text{CH}_4$  gegenüber dem schwereren  $^{13}\text{CH}_4$  bevorzugt oxidiert wird. Die von den methanoxidierenden Prokaryoten gebildete Biomasse weist demzufolge niedrigere  $^{13}\text{CH}_4$  zu  $^{12}\text{CH}_4$  Verhältnisse auf, als das im umgebenden Medium gelöste Methan (ALPERIN AND REEBURGH 1988, BURNS 1998, JAHNKE et al. 1999). Solche erniedrigten  $\delta^{13}\text{C}$ -Werte ließen sich nun auch in für Archaea charakteristischen Lipid-Biomarkern (Archaeolen) an den entsprechenden Standorten nachweisen (ELVERT et al. 2000, PANCOST et al. 2000). Die gleichzeitig auftretende starke Dominanz spezieller Archaea-Gruppen (ANME-1 und 2) in den aktiven Sediment-Horizonten machte diese zu wahrscheinlichen Kandidaten für den methanoxidierenden Part in der syntrophen Gemeinschaft (HINRICHS et al. 1999, MICHAELIS et al. 2002, TESKE et al. 2002).

Die ähnlich niedrigen  $\delta^{13}\text{C}$ -Werte in den für die assoziierten SRB kennzeichnenden Lipid-Biomarkern sprechen für das Vorhandensein eines bei der reversen Methanogenese entstehenden Intermediates, das in der Folge den syntrophen Sulfatreduzierern als Kohlenstoffquelle dient. Aktuelle Modelle favorisieren in diesem Zusammenhang eine Reaktion, bei der die Übertragung des Methan-Kohlenstoffes auf Acetat bei gleichzeitiger Bildung von molekularem Wasserstoff erfolgt (DELONG 2000, BOETIUS et al. 2000).

Durch Laborversuche mit Konsortien in Sedimenten vom Hydrate Ridge konnte 2001 (NAUHAUS et al. 2002) schließlich gezeigt werden, daß diese unter anoxischen Bedingungen bei Oxidation definierter Mengen von Methan äquimolare Mengen an Sulfid produzierten. Damit war nun auch ein physiologischer Beweis für die Verknüpfung der beiden an der anaeroben Methanoxidation beteiligten Prozesse erbracht.

### 3 Geologische und geochemische Grundlagen sowie Charakterisierung der beprobten Standorte

#### 3.1 Plattentektonik

Die Erde ist ein Konvektionssystem, dessen abgekühlte und verdickte Oberflächenschicht (*Lithosphere*) in Platten unterteilt ist, die sich relativ zueinander bewegen. Die lithospherischen Platten werden dabei durch Konvektionsbewegungen einer unter ihnen liegenden heißen flüssigen Schicht (*Asthenosphere*) in Bewegung gehalten. Die Relativbewegungen, die mit Geschwindigkeiten von 1 bis 20 cm pro Jahr erfolgen, und die daraus resultierenden Wirkungen bezeichnet man als *Plattentektonik* (BURG 2003). Hierbei werden drei Bewegungstypen unterschieden:

Divergenz = Auseinanderbewegung benachbarter Platten

Konvergenz = Bewegung benachbarter Platten aufeinander zu

Blattverschiebung = Aneinander Vorbeigleiten benachbarter Platten

In Bereichen *divergierender Plattengrenzen* wird die Lithosphäre dünner und es kommt zu einer fortschreitenden Aufschmelzung durch das darunterliegende flüssig-heiße Gestein (Magma) der Asthenosphäre. Weiteres Auseinanderweichen führt schließlich zu einem Aufbrechen der äußeren Schichten. Durch die entstehenden Gräben und Spalten dringt Magma empor, kühlt ab und bildet neue Lithosphäre. Man spricht daher auch von konstruktiven Plattengrenzen. Der größte Teil der divergenten Plattengrenzen liegt in den ozeanischen Becken. Ihr physiographisches Merkmal ist eine symmetrische Relieferhöhung zu beiden Seiten der talförmigen, dynamisch aktiven Spreizungszone (*Rift Zone* oder *axiales Rifttal*). Diese ozeanischen Gebirgsrücken (z.B. Mittelatlantischer Rücken) sind gegenüber der benachbarten Lithosphäre erhöht, weil sie ständig von noch jungem, weniger dichten Gestein unterlagert werden.

Die häufigste strukturelle Reaktion auf das an **konvergierenden Plattengrenzen** auftretende Platzproblem ist das Abtauchen einer Platte unter die andere (**Subduktion**). Der von Konvektionsströmungen im Erdinnern unterstützte Prozeß wird in erster Linie von zwei Kräften angetrieben:

Rückendruck = Gravimetrische Kraft, aufgrund derer eine Platte vom erhöhten Rücken ihrer divergenten Plattengrenze wegrutscht

Plattenzug = Gravimetrische Kraft, durch die der ältere und somit dichtere Teil einer Platte in die Asthenosphäre absinkt

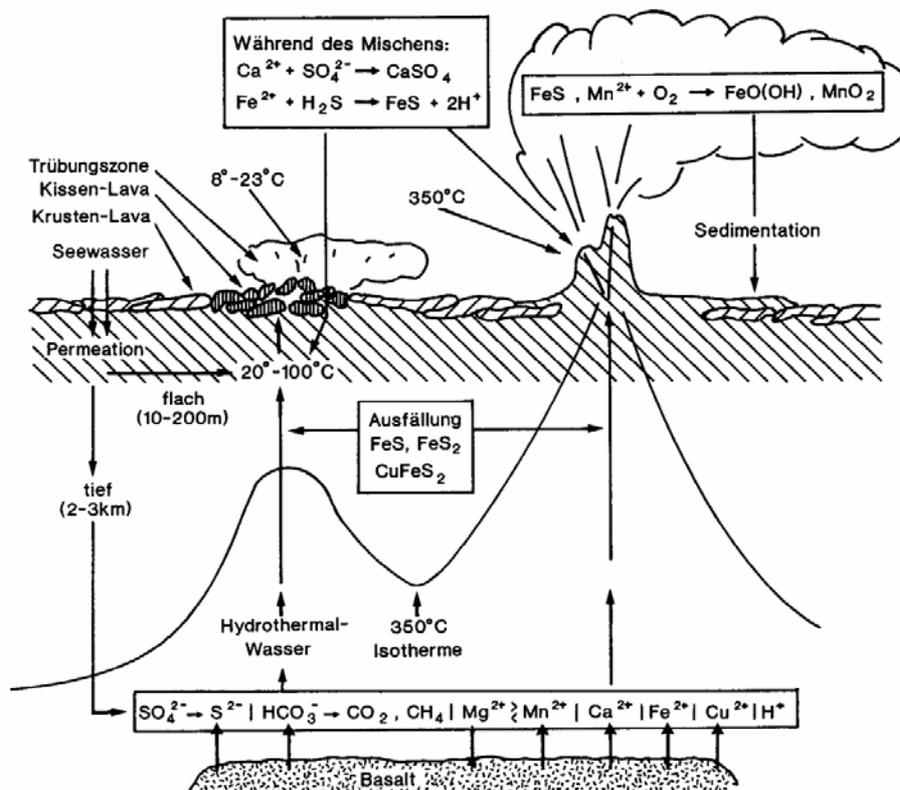
Da die abtauchende Platte hierbei fortwährend aufgeheizt und nach und nach vom Erdinneren absorbiert wird, werden Subduktionszonen auch als destruktive Plattengrenzen bezeichnet.

Sedimente, die in verschiedenen Schichten auf der subduzierenden Platte abgelagert wurden, werden an der Plattengrenze von der überfahrenden Platte abgeschert und zu einem in seiner Schichtung verformten **Akkretionskeil** aufgestaut. Tiefer gelegene subduzierte Gesteinsschichten unterliegen bedingt durch zunehmenden Druck und steigende Temperaturen einer Metamorphose (metamorphe Gesteine).

Die Konvergenz zweier ozeanischer Plattengrenzen wird oft durch die Entstehung von Vulkanketten begleitet. Diese werden durch geschmolzenes Material der subduzierten Platte gespeist, welches aufgrund seiner Auftriebskraft die überfahrende Platte an verschiedenen Stellen durchbricht. Gleichzeitig wird hierbei Magma an der Unterseite der Erdkruste akkumuliert. Diese Vorgänge führen zur Bildung eines magmatischen Bogens (**Magmatic Arc**) parallel zur konvergenten Plattengrenze, wobei der Bogen wegen der kugelförmigen Geometrie der Platten in Richtung zur subduzierenden Platte konvex ist. Beispiele für auf diese Weise entstandene Strukturen sind die Inselbögen (**Island Arcs**) der Philippinen und der Neuen Hybriden. Auf der konvexen Seite des Inselbogens befindet sich an der Grenze zwischen abtauchender und überfahrender Platte eine topographische Vertiefung (Ozeanische Rinne = **Oceanic Trench**). Den Bereich zwischen ozeanischer Rinne und Inselbogen bezeichnet man als **Forearc**, den auf der konkaven Seite des Inselbogens als **Backarc**. Beide Areale unterliegen in Abhängigkeit von der Dynamik der beteiligten Platten ihrerseits Kompressions-, Extensions oder Blattverschiebungs-Deformationen, die auch dort Auslöser für vulkanische und geothermische Aktivität sein können.

### 3.2 Hydrothermalismus

Der größte Teil der kontinentalen Plattengrenzen liegt in den ozeanischen Becken. Der im Zuge der tektonischen Prozesse auftretende mechanische Streß führt hier zur Bildung von Rissen und Spalten in der Erdkruste. Durch diese Verwerfungen kann das Meerwasser leichter in die Lithosphäre vordringen und kommt auf seinem Weg in die Tiefe zunehmend in Kontakt mit Gestein, das durch aufsteigendes Magma erhitzt wird. Bei Temperaturen um die 60°C werden hierbei zunächst der gelöste Sauerstoff und Kalium, später auch Kalzium und Magnesium entfernt. Sulfat wird zu Sulfid reduziert und vermehrt Bikarbonat zu CO<sub>2</sub> umgesetzt. Außerdem werden die entstehenden Fluide zunehmend sauer. Aufgrund des hohen Druckes, der in diesen Tiefen herrscht, liegt der Siedepunkt des Wassers erheblich höher als unter Normaldruck. So können bei Wasser-Temperaturen um 150°C Natrium, Kalium und Kalzium, und bei ca. 350°C auch Schwefel und Metalle, wie Kupfer, Zink, und Eisen aus dem umgebenden Gestein gelöst werden (JANNASCH AND MOTTL 1985, www.divediscover.who.edu). Ferner entsteht bei diesen hohen Temperaturen und den reduzierenden Bedingungen aus gelöstem Bikarbonat Methan. Bei dieser **abiogenen Methanbildung** fungieren Metallverbindungen im erhitzten Gestein als Katalysatoren (HORITA AND BERNDT 1999, SHERWOOD LOLLAR et al. 2002).



**Abbildung 2.** Hydrothermale Zirkulation an warmen und heißen Tiefseequellen (verändert nach JANNASCH 1986).

An einem bestimmten Punkt überwiegen dann die Auftriebskräfte und die heißen, sauren, anoxischen und mit Metallen und reduzierten Verbindungen angereicherten **hydrothermalen Fluide** streben gemäß den Wegsamkeiten zurück nach oben. Können stark erhitzte Fluide relativ ungehindert bis zum Meeresboden vordringen, kühlen sie nur wenig ab und es entstehen dort fokussierte heiße Fluidaustritte (**Hot Vents, High-Temperature Vents**). Bei der Vermischung mit dem (2-4°C) kalten sauerstoffreichen Meerwasser fallen Metall-Sulfide und Kalziumsulfat aus. Bei anhaltender hydrothermalen Aktivität bilden sich hieraus nach und nach Schlote, aus denen (primär durch Eisensulfide) schwarz gefärbte Fontänen austreten. Entsprechend ihrem Habitus werden solche Hydrothermalquellen als **Black Smoker** bezeichnet. Die von ihnen abgesonderten „Rauchwolken“ aus mit hydrothermalen Fluiden angereichertem Meerwasser, die sogenannten **Hydrothermal Plumes**, lassen sich noch Kilometer entfernt als Temperaturanomalien in der Wassersäule nachweisen. Häufiger, wenn auch weniger spektakulär sind Hydrothermalfelder, in denen eine unwegsame Gesteins- oder Sedimentpassage die aufsteigenden Fluide stärker abkühlt und über eine größere Austrittsfläche am Meeresboden verteilt (**diffuse Fluidaustritte**). Die Temperaturen solcher schon vor dem Austritt meist stark verdünnter und chemisch veränderter Fluide liegen mit 8-40°C deutlich niedriger als die der bis zu 400°C heißen Hot Vent - Fluide (JANNASCH AND TAYLOR 1984, MCCOLLOM AND SHOCK 1997). Man spricht daher auch von warmen Quellen (**Warm Vents, Low-Temperature Vents**).

### 3.2.1 Das Nord-Fiji-Becken

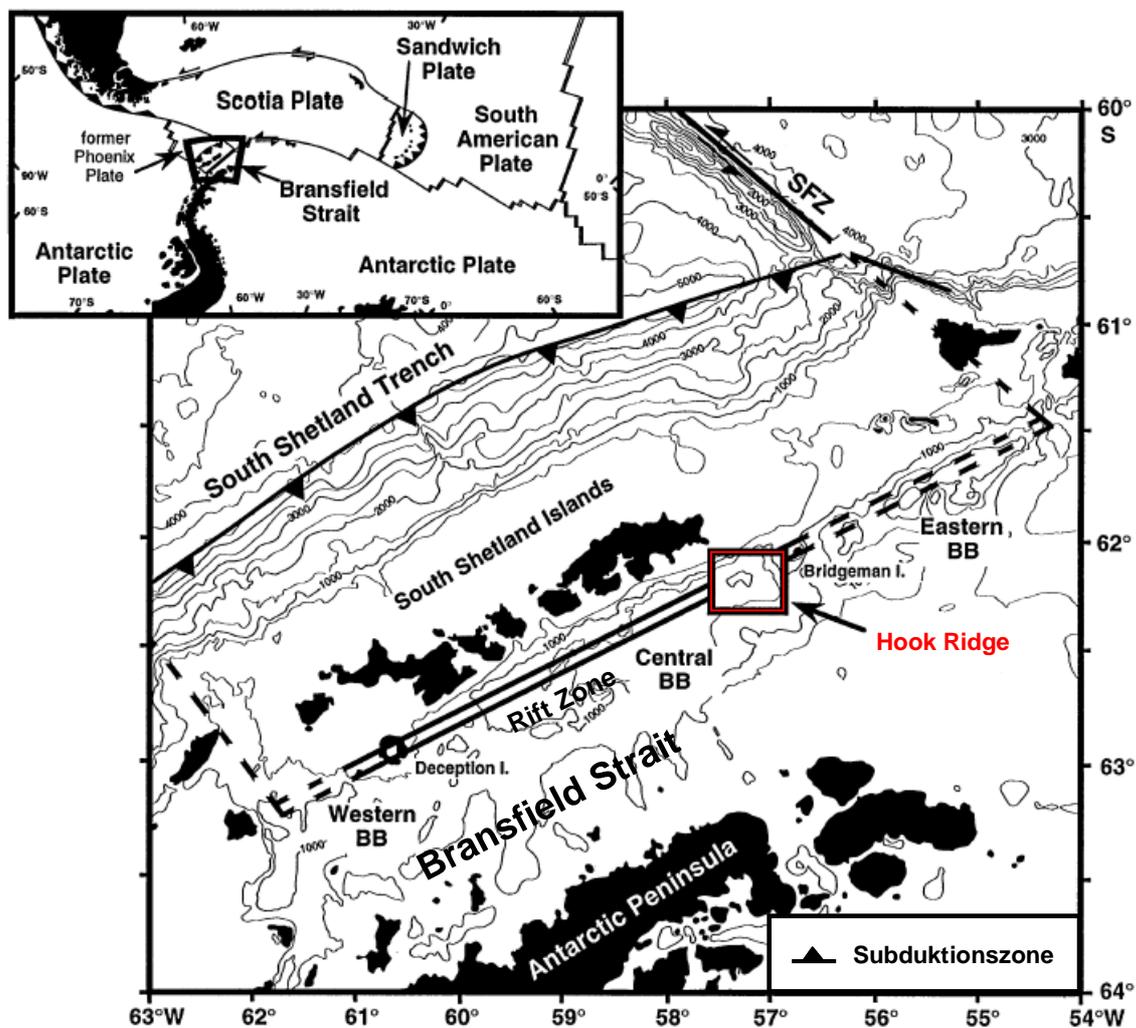
Das im Südost-Pazifik nordöstlich des australischen Kontinentes gelegene Nord-Fiji-Becken (Abb. 3) ist ein durch ozeanische Divergenz entstandenes Backarc-Becken (PYSKLYWEC et al. 2003). Es befindet sich im Übergangsbereich zwischen Indo-Australischer und Pazifischer Platte und wird durch zwei Subduktionszonen gegenläufiger Polarität begrenzt: Einer nach Osten unter den Inselbogen der Neuen Hybriden (Vanuatu) abtauchenden Subduktionszone und der nach Westen abtauchenden Tonga - Subduktionszone. Im tektonisch komplexen Backarc-Bereich des Nord-Fiji-Beckens befinden sich mehrere aktive Spreizungszentren (MANTOVANI et al. 2001).

Das während der HYFIFLUX II - Expedition im zentralen Bereich des Beckens beprobte Gebiet (Areal A, Abb. 3) lag im axialen Graben einer 18 km langen Spreizungszone, die seitlich von 500 - 600 m hohen krustalen Aufwölbungen flankiert und im Norden von einem kollabierten ehemaligen Lava-See begrenzt wurde. Hier traten die hydrothermalen Fluide direkt aus Spalten in dem noch jungen basaltischen Gestein, das von einer teilweise üppigen Vent-Fauna besiedelt war (s. Kap. 8.4, S. 64).



### 3.2.2 Die Bransfield Straße

Die Bransfield Straße liegt an der Nordspitze der Antarktischen Halbinsel im Bereich der Antarctica-Phoenix-Plattengrenze. Sie repräsentiert ein im Hinterland des Süd-Shetland Inselbogens gelegenes Backarc-Becken auf der antarktischen Platte (Abb. 4). Die reduzierte Subduktion der Phoenix-Platte unter die antarktische Platte führt dort auch im Backarc-Bereich zu langsam voranschreitenden Extensionsdeformationen. Der hiermit einhergehende Vulkanismus manifestiert sich im Bereich der zentralen Bransfield Straße in Form mehrerer vulkanischer Strukturen (u.a. Deception Island und Hook Ridge). Aufgrund der geringen Spreizungsraten liegt in diesem Gebiet eine durchhaltende Sedimentbedeckung vor, die zum überwiegenden Teil aus vulkanischen und zum geringeren Teil aus pelagischen Komponenten besteht (BOHRMANN et al. 1999).



**Abbildung 4.** Tektonische Karte der Bransfield Straße (verändert nach BOHRMANN et al. 1999).

BB = Bransfield Basin, SFZ = Shackleton Fracture zone

Während der HYDROARC - Forschungsfahrt konnten am Kraterrand vom Hook Ridge (Abb. 4) diffuse Fluidaustritte mit Temperaturanomalien von bis zu 48°C nachgewiesen werden. Abgesehen von einigen kleinen Pogonophoren wurden hier jedoch keine größeren Ansammlungen typischer Vent-Fauna gefunden.

### 3.3 *Gashydrat-Lager und Gas-Seeps*

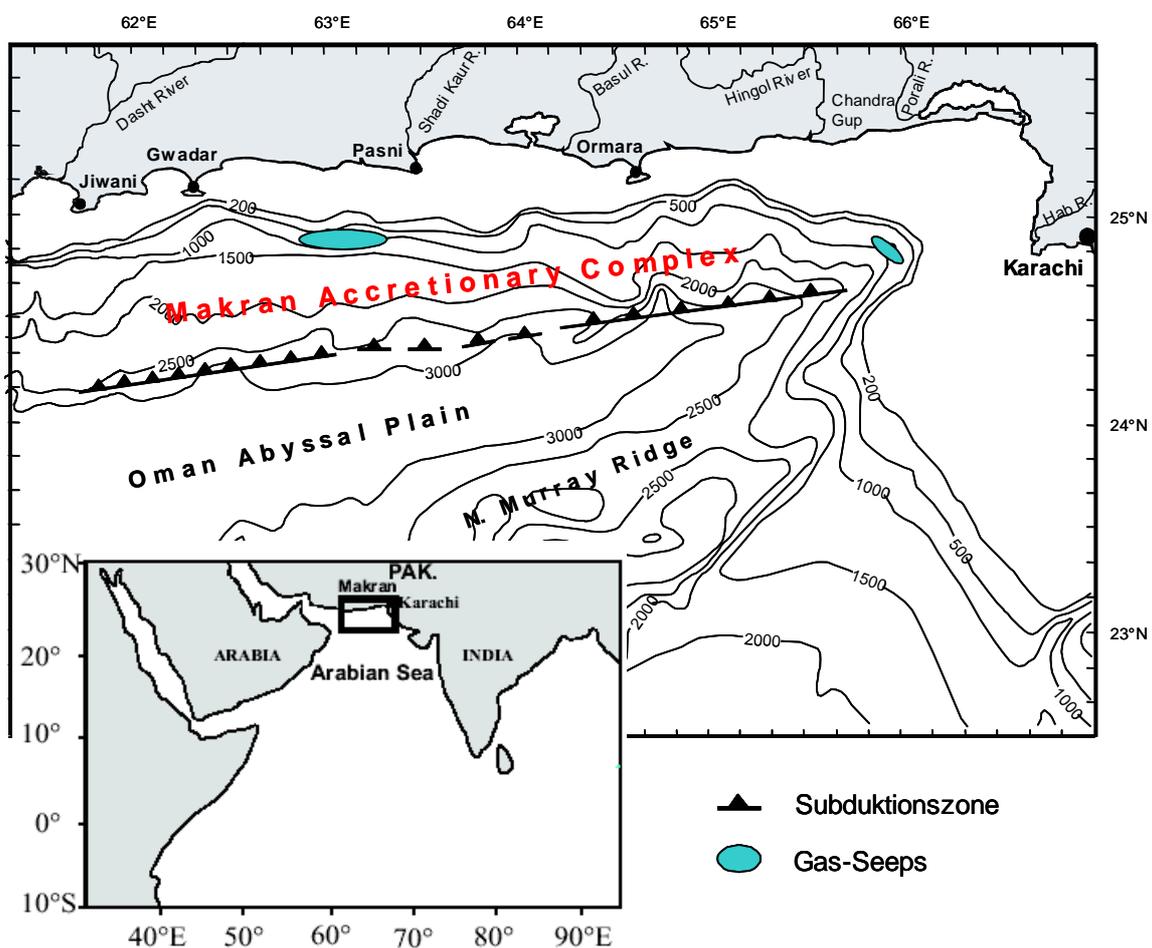
Gashydrat-führende Sedimentschichten (***Gashydrat-Lager***) verlaufen meist parallel zum Meeresboden (Gashydrate s. Kap. 2.2, S. 6). Sie lassen sich durch seismische Untersuchungen nachweisen. Kennzeichnend ist hierbei der sogenannte Bottom Simulating Reflektor (***BSR***), der sich an der Unterkante des Lagers durch den extremen Dichteunterschied zwischen dem durch Gashydrate zementierten Sediment und Sedimentschichten mit freiem Gas im Porenraum abzeichnet (SUESS et al. 1999).

Werden Gashydrat-Lager im Zuge tektonischer Prozesse in tiefer gelegene wärmere Schichten subduziert oder durch Auffaltungsprozesse angehoben und somit geringeren Drücken und höheren Temperaturen ausgesetzt, werden die Kristallstrukturen destabilisiert. Das entstehende, mit Gasen angereicherte Hydrat-Wasser migriert dann entsprechend den Wegsamkeiten nach oben, vermischt sich dabei zu Teilen mit dem Porenwasser des Sediments und tritt meist als diffuse Süßwasserfahne am Meeresboden aus. Die methanreichen Fluide haben dabei annähernd die gleiche Temperatur wie das umgebende Meerwasser. Ihre Austrittsstellen werden deshalb als ***Cold Seeps*** (kalte Quellen) oder ***Gas-Seeps*** bezeichnet.

Wie an Hydrothermalquellen leben auch an Cold Seeps chemotrophe Prokaryoten, die ihren Energiebedarf durch die Oxidation der hier austretenden Verbindungen (Methan und Schwefelwasserstoff) decken. An einigen Standorten bilden Schwefeloxidierende Bakterien (*Beggiatoa* und/oder *Thioploca*) weißliche Matten. An anderen Stellen leben thiotrophe oder methanotrophe Arten in Symbiose mit spezialisierten Bivalvia (*Calyptogena* und *Acharax*, SUESS et al. 1999; *Bathymodiulus*, FUJIWARA et al. 2000). Außerdem findet man häufig weißliche Ablagerungen von Kalziumkarbonat (Chemoherme), die allerdings überwiegend anorganischen-chemischen Ursprungs sind. Sie entstehen dadurch, daß sich das im Zuge der biologischen Methanoxidation gebildete Hydrogencarbonat mit im Meerwasser gelösten Kalzium-Ionen verbindet.

### 3.3.1 Der Makran-Akkretionskeil

Der Makran-Akkretionskeil umfaßt ein Küstengebiet im nördlichsten Teil des Indischen Ozeans zwischen der Arabischen Halbinsel und Indien (Abb. 5). In diesem Gebiet subduziert der ozeanische Teil der arabischen unter die kontinentale eurasische Platte. Dabei wurden die 7 km mächtigen ozeanischen Sedimente teilweise abgeschert und zu einem bis 15 km mächtigen Akkretionskeil aufgefaltet, von dessen Fläche sich jedoch nur rund 1/5 ins arabische Meer erstreckt. Wegen der sehr starken Sedimentzufuhr vom Kontinent fehlt hier an der Plattengrenze der sonst morphologisch charakteristische Tiefseegraben (GREVEMEYER et al. 2000).



**Abbildung 5.** Tektonische Karte des Makran-Akkretionskomplexes (verändert nach VON RAD et al. 2000).

Durch die Auffaltungsprozesse destabilisierte Gashydrate speisen an verschiedenen Stellen der Makran-Akkretion mit Methan (und H<sub>2</sub>S) angereicherte Fluide, die größtenteils in diffusen Seeps, manchmal aber auch durch kleine Krater im Sediment (Pockmarks) austreten (VON RAD et al. 2000).

Im Bereich der während der Makran II - Expedition beprobten Gas-Seeps fanden sich häufig mit Bakterienmatten (*Thioploca*, SCHMALJOHANN et al. 2001) bedeckte Flächen, jedoch keine Makrofauna.



# *Material und Methoden*

## **4 Probennahme**

### *4.1 Wasserproben (Projekt HYFIFLUX II)*

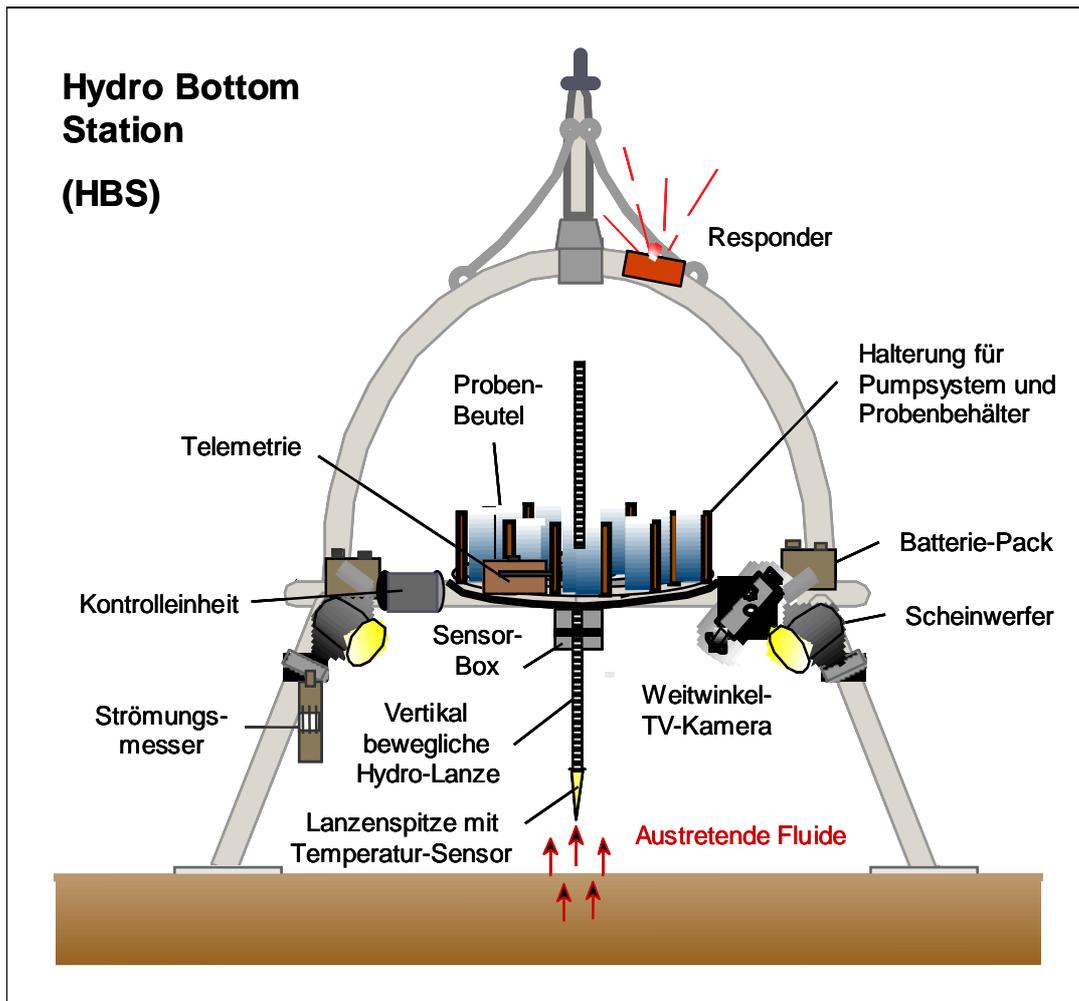
Proben aus der Wassersäule wurden mit einem Kranzwasserschöpfer (KWS, FS Sonne) gezogen, an dem zur Bestimmung von Wassertiefe, Temperatur und Salzgehalt eine Multisonde (MS, FS Sonne) angebracht war. Hierdurch konnten gezielt Wasserkörper mit Temperatur- und Salzgehalts-Anomalien (Hydrothermal Plumes) beprobt werden.

Im bodennahen Bereich wurden die Wasserproben mit Hilfe der Hydro Bottom Station (HBS, FU Berlin) genommen. Dieser mit einer Videokamera ausgestattete Tiefsee-Lander (Abb. 6, S. 22) verfügte über eine vertikal bewegliche Lanze, an deren Spitze ein Temperatursensor montiert war und über die gleichzeitig die Probennahme erfolgte. Durch diese Konstruktion wurde eine kontrollierte Beprobung in verschiedenen Abständen zur Hydrothermalquelle ermöglicht.

### *4.2 Sedimentproben (Projekte MAKRAN II und HYDROARC)*

Sedimente wurden überwiegend mit einem Multicorer (MC, GEOMAR Kiel) beprobt. Dieser Tiefsee-Lander kann zur Entnahme von 8 parallelen Sedimentkernen mit Stechrohren bis zu 50 cm Länge bestückt werden. Ist das Sediment nicht zu weich, bleibt die natürliche Struktur und Schichtung in den Kernen relativ gut erhalten.

Teilweise wurden auch Proben mit einem videokontrollierten TV-Greifer (TVG, FS Sonne) gewonnen. Hierbei handelte es sich jedoch nur um Material von der Sedimentoberfläche bzw. den obersten Schichten, da die tiefer liegenden Sedimentschichten durch den Greifvorgang stark gestört wurden.



**Abbildung 6.** oben: Hydro Bottom Station (nach HALBACH et al. 2001),  
 unten: Probennahme mit der Hydro-Lanze an einer mit Muscheln besiedelten warmen Quelle im Nord-Fiji-Becken.

## 5 Physikalische und chemische Parameter

### 5.1 Temperatur, Salzgehalt und pH-Wert

Temperatur, Salzgehalt und pH-Wert wurden direkt mit Hilfe elektronischer bzw. elektrochemischer Sonden gemessen.

### 5.2 Schwefel-Verbindungen

Proben zur Bestimmung der Konzentrationen der verschiedenen relevanten Schwefel-Verbindungen (Sulfid, Sulfat, Thiosulphat und Elementarschwefel) wurden an Bord zunächst extrahiert und fixiert. Die eigentlichen Konzentrationsmessungen erfolgten nach entsprechender Aufbereitung ionenchromatographisch im Heimplabor (PODGORSEK und DREWS unveröffentlicht). Wasserproben konnten hierbei direkt fixiert und eingefroren (-18 bis -40°C) werden. Bei Sedimentproben wurde vorher meist das Porenwasser von der partikulären Fraktion getrennt. So wurde für die Sulfid- und Thiosulfat-Bestimmungen das Porenwasser zuerst durch Zentrifugation separiert und anschließend mit Monobromobiman fixiert (NEWTON et al. 1981, FAHEY AND NEWTON 1987). Für die Sulfat-Messungen wurde das Porenwasser mit Argon-Gas aus dem Sediment gepreßt. Die Partikel wurden hierbei durch Celluloseacetat-Filter mit 0,45 µm Porendurchmesser zurückgehalten. Sedimentproben für die Elementarschwefel-Analyse wurden hingegen direkt mit 20%iger Zinkacetat-Lösung fixiert.

Bei niedrigen pH-Werten (kleiner gleich pH 6) repräsentieren die gemessenen Sulfid-Werte im wesentlichen den Schwefelwasserstoffgehalt, da dieser unter sauren Bedingungen überwiegend in undissozierter Form vorliegt.

### 5.3 Nitrat

Die Konzentrationen von Nitrat wurden ebenfalls ionenchromatographisch im Heimplabor bestimmt. Wasserproben wurden direkt bei -21°C eingefroren. Bei Sedimentproben wurde das Porenwasser vorher abzentrifugiert.

#### 5.4 *Gelöster anorganischer Kohlenstoff*

Die Konzentration an gelöstem anorganischen Kohlenstoff (DIC = dissolved inorganic carbon) im Porenwasser frischer Sedimentproben wurde aus den Werten für Gesamtalkalinität und Salzgehalt unter Einbeziehung von pH-Wert und Temperatur ermittelt. Hierbei war es nicht notwendig die Gesamtalkalinität durch Subtraktion der Borat-Alkalinität in Karbonat-Alkalinität umzurechnen, da die Borat-Alkalinität an den untersuchten Stationen gegen 0 tendierte. Die Konzentrationen der verschiedenen Komponenten des Karbonatsystems wurden letztlich mit Hilfe der von HANSSON (1973) beschriebenen Dissoziationskonstanten bei verschiedenen Temperaturen und Salzgehalten berechnet.

#### 5.5 *Methan*

Zur Bestimmung der Methankonzentrationen in **Sedimentproben** (MAKRAN II und HYDROARC) wurden aus frischen Sedimentkernen mit Hilfe beschnittener Einwegspritzen 5 ml - Unterproben genommen. Diese wurden dann in 20 ml - Schraubdeckel-Fläschchen mit Butylgummi-Septen injiziert, die mit 5 ml übersättigter Salzlösung gefüllt waren. Die Fläschchen wurden sofort verschlossen und intensiv geschüttelt, um die mikrobielle Aktivität zu unterbinden und gleichzeitig das im Porenwasser gelöste Methan in die Gasphase zu zwingen. Parallelproben aus dieser Gasphase wurden anschließend in einem portablen Gaschromatographen (Marine Biological Association of the UK, Plymouth, UK) auf ihren Methangehalt untersucht. Der Gaschromatograph war mit einem Figaro TGS711 Solid State Detektor (Figaro, Japan) und einer 2 m langen mit 13X Molecular Sieve gepackten Säule ausgestattet. Als Trägergas diente Stickstoff bei einem Durchlauf von 3 bis 6 ml min<sup>-1</sup>. Zur Regeneration wurde zusätzlich Sauerstoff (0,25 bis 0,5 ml min<sup>-1</sup>) am Detektor vorbeigeleitet.

Die Methankonzentrationen in den während der HYFIFLUX II - Fahrt bearbeiteten **Wasserproben** wurden durch die Arbeitsgruppe von RICHARD SEIFERT (Universität Hamburg) ebenfalls gaschromatographisch bestimmt.

## 6 Mikrobiologische Parameter

### 6.1 Gesamtbakterienzahl und mittleres Biovolumen

Zur Ermittlung der Gesamtbakterienzahl (nur Wasserproben) wurden zunächst 100 ml Probe mit Borax-gepuffertem Formalin fixiert (2% Formaldehyd Endkonzentration). Anschließend wurden Unterproben auf geschwärzte Polycarbonat-Filter mit 0,2 µm Porendurchmesser (Fa. Poretics) filtriert und 5 min mit 0,03 % w/v Acridine Orange - Lösung gefärbt (HOBIE et al. 1977). Die Filter wurden auf Objektträgern in Immersionsöl (Typ A, Fa. Cargille) eingebettet, anschließend bei -18°C tiefgefroren und innerhalb von 3 Wochen ausgezählt (TURLEY & HUGHES 1992). Die mikroskopische Analyse erfolgte mit einem Zeiss Axioplan Fluoreszenzmikroskop (Blau-Filtersatz 450 - 490 nm, 100er Neofluar Objektiv, 10er Okular). Zur Auszählung wurde ein New Porton G12 Raster (Fa. Graticules Ltd.) verwendet. Es wurden jeweils 20 Raster, mindestens aber 400 Zellen ausgezählt und zur Berechnung des mittleren Biovolumens jeweils 50 Zellen pro Probe vermessen.

### 6.2 Bakterielle Sekundärproduktion

Die Sekundärproduktion der heterotrophen Bakterien (nur Wasserproben) wurde anhand der Inkorporation von <sup>3</sup>H-Leucin bestimmt (FUHRMAN AND AZAM 1982). Die verwendeten Endkonzentrationen lagen für L-[4,5-<sup>3</sup>H]-Leucin (Fa. Amersham), nach Verdünnung mit unmarkiertem Leucin, bei 100 - 110 nmol/l. Es wurden je 3 Parallelen und ein mit Formalin fixierter Blindwert angesetzt (1% Formaldehyd Endkonzentration). Die Inkubation erfolgte im Labor bei *in situ* - Temperatur für 60 min (bei Wassertemperaturen über 10°C) bzw. 120 min (bei Wassertemperaturen unter 10°C) und wurde mit Formalin abgestoppt. Anschließend wurden die Ansätze durch Polycarbonat-Filter mit 0,2 µm Porendurchmesser (Fa. Poretics) filtriert und diese 10mal mit je 1 ml 5-prozentiger eiskalter Trichloressigsäure (Fa. Fluka) gespült. Schließlich folgte die Überführung der Filter in Lumagel Scintillations-Cocktail (Fa. Baker) und die Messung mit einem Tri Carb 2100 TR Scintillationszähler der Firma Packard. Zur Umrechnung des inkorporierten radioaktiven Materials in bakterielle Sekundärproduktion wurden empirisch gewonnene Konversionsfaktoren herangezogen (SIMON und AZAM 1989).

### 6.3 Methan-Oxidation und -Inkorporation

#### 6.3.1 Methode

Die Bestimmung des Methanumsatzes durch aerobe oder anaerobe Prozesse erfolgte ebenfalls radiochemisch unter Verwendung von  $^{14}\text{C}$ -markiertem Methan als Substrat.

Radioaktiv markiertes Methan wurde mit Hilfe methanogener Archaea (*Methanobacterium thermoautotrophicum*) gewonnen, welche das Gas aus  $\text{H}^{14}\text{CO}_3^-$  und  $\text{H}_2$  synthetisieren. Nach HARDER (1997) von  $^{14}\text{CO}$  befreites  $^{14}\text{CH}_4$  wurde von T. BURK (Forschungs- und Technologie-Zentrum, Büsum) zur Verfügung gestellt.

#### 6.3.2 Durchführung

**Wasserproben** wurden unmittelbar nach der Probennahme in 5 gasdichte 100 ml Krimp-Flaschen (Fa. Alltech) gefüllt und luftblasenfrei verschlossen. Anschließend wurde eine bekannte Menge von in sterilem Wasser gelöstem  $^{14}\text{CH}_4$  durch ein Septum im Krimp-Verschluß injiziert. Zur Ermittlung und Kontrolle der zugesetzten Aktivität wurden in regelmäßigen Abständen (insbesondere zu Beginn und gegen Ende des Injektionsvorganges) zusätzlich 2 x 100  $\mu\text{l}$  Tracerlösung in mit 5 ml 1N NaOH teilbefüllte 16 ml - Kontrollröhrchen gegeben. Nach intensivem Schütteln wurden die Ansätze bei den entsprechenden *in situ* - Temperaturen im Dunkeln liegend inkubiert. Eine von Beginn an mit 100  $\mu\text{l}$  10N NaOH versetzte Blindprobe wurde den gleichen Bedingungen unterworfen. Die anderen 4 Parallel-Ansätze wurden jeweils nach 4, 8, 16 und 24 h ebenfalls durch Zugabe von NaOH abgestoppt.

Zur Bestimmung des zu  $^{14}\text{CO}_2$  oxidierten Anteils am  $^{14}\text{C}$  markierten Methan wurden die abgestoppten Ansätze in 250 ml - Schott-Flaschen überführt, welche mit einem Gummistopfen gasdicht verschlossen werden konnten. Das durch Zugabe von 300  $\mu\text{l}$  10N  $\text{H}_2\text{SO}_4$  ausgetriebene  $^{14}\text{CO}_2$  wurde in mit 200  $\mu\text{l}$  Ethanolamin getränkten Filterpapierstreifen aufgefangen. Die Streifen wurden hierbei in offenen, mit einem Bindfaden versehenen, 5 ml - Scintillations-Vials (Fa. Packard) in die Schott-Flaschen eingehängt und nach 24stündigem Ausgasen mit diesen entnommen. Anschließend wurden die Vials verschlossen und bei 4°C an Bord zwischengelagert. Im Isotopenlabor des Instituts wurden später jeweils 1 ml Ethanol als Lösungsvermittler und dann 4,5 ml Scintillations-Cocktail (Lumagel, Fa. Packard) hinzugegeben.

Zur Bestimmung des aus dem markierten Methan in die Zellsubstanz inkorporierten  $^{14}\text{C}$  wurde der in den Schott-Flaschen verbliebene Ansatz nun durch 0,2  $\mu\text{m}$

Cellulose-Acetat-Filter filtriert. Die Filter wurden anschließend in geschlossenen 5 ml - Scintillations-Vials bei 40°C getrocknet und danach bei Raumtemperatur an Bord zwischengelagert. Im Isotopenlabor des Instituts wurden die Filter später in jeweils 4,5 ml Scintillations-Cocktail (Lumagel, Fa. Packard) über 24 h aufgelöst.

Aus mit dem Multicorer genommenen **Sedimentproben** wurden aus den oberen 20 cm mit Hilfe von Plexiglasrohren ( $\varnothing$  24 mm) parallele Unterproben gestochen. Diese Rohre verfügten in 1 cm - Abständen über seitliche Injektionsports und wurden unmittelbar nach der Probennahme mit Butylgummi-Stopfen gasdicht verschlossen. Durch jeden der ebenfalls silikonversiegelten Ports wurde nun eine Gasmischung aus 0,2%  $^{14}\text{C}$ -Methan (spezifische Aktivität  $27,7 \mu\text{Ci } \mu\text{mol}^{-1}$ ) in Wasserstoff injiziert. Die so präparierten Sedimentkerne wurden dann für 12 h bei *in situ* - Temperatur im Dunkeln inkubiert. Um ein Eindringen von Sauerstoff zu verhindern, wurden die Rohre während der Inkubation unter Stickstoff gelagert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das Sediment schrittweise aus dem Plexiglasrohr geschoben und in 1cm dicke Scheiben geschnitten. Diese wurden sofort in 20 ml 1N NaOH fixiert, geschüttelt und an Bord bei 4°C zwischengelagert.

Im Isotopenlabor des Instituts wurde das Sediment zur Austreibung des zu  $^{14}\text{CO}_2$  oxidierten Anteils an markiertem Methan ( $^{14}\text{CO}_2\text{ox}$ ) angesäuert und die resultierende Gasmenge in Ethanolamin aufgefangen (s. Bearbeitung der Wasserproben S. 26). Danach wurden jeweils 1 ml Ethanol als Lösungsvermittler und 4,5 ml Scintillations-Cocktail (Lumagel, Fa. Packard) hinzugegeben.

Zur Bestimmung des in die Biomasse inkorporierten  $^{14}\text{C}$  - Anteils an markiertem Methan ( $^{14}\text{C}$  ink) wurden das nun  $\text{CO}_2$ - und Karbonat-freie Sediment getrocknet und in einem Mörser zerkleinert. Hiervon wurden 150 mg Aliquots mit Zellulosepulver zu Pellets gepreßt und in einem OX500 Biological Oxidizer (Fa. Zinsser Analytic) verbrannt. Das dabei entstandene  $^{14}\text{CO}_2$  wurde in einer 3:7 Mischung aus Packard Carbo Sorb E und Packard Permafluor V aufgefangen.

Die Menge an radioaktiven Zerfällen wurde mit einem Tri Carb 2100 TR Scintillationszähler der Firma Packard bestimmt.

### 6.3.3 Bestimmung der zugesetzten Aktivität

Hierzu wurde die Gasphase der während des Injektionsvorganges mit Tracerlösung beschickten Kontrollröhrchen auf Methangehalt und Radioaktivität untersucht. Dies geschah mit Hilfe eines für diese Zwecke modifizierten Gaschromatographen (Fa. Packard). Dabei wurden aus jedem Röhrchen 3 Parallelen von je 200  $\mu\text{l}$  Gas in das Gerät injiziert. Dort wurde die Methankonzentration durch einen Flammenionisationsdetektor analysiert, der das Methan zu  $^{14}\text{CO}_2$  verbrannte. Dies wurde nun durch 3 nacheinander geschaltete Gefäße mit je 10 ml  $\text{CO}_2$ -Absorber (1,25 ml Ethanolamin und 8,75 ml Ethylenglykol-Monomethylether) geleitet, in welchen das

markierte CO<sub>2</sub> quantitativ aufgefangen wurde. Nach Zugabe von jeweils 10 ml Lumagel Cocktail (Fa. Packard) wurde dann die Aktivität im Scintillationszähler bestimmt. Anschließend wurden die Werte für die 3 hintereinandergeschalteten Gefäße aufaddiert und vom in den Gaschromatographen injizierten Volumen auf die gesamte im Kontrollröhrchen vorhandene Gasmenge hochgerechnet.

#### 6.3.4 Berechnung der Raten

Zur Berechnung des Methanumsatzes in **Wasserproben** wurden zunächst von den Rohdaten die Blindwerte abgezogen. Danach konnte aus den korrigierten Werten für die zu verschiedenen Zeitpunkten abgestoppten Ansätze mittels linearer Regression die mittlere Anzahl der radioaktiven Zerfälle (MARZ) pro Probe und Tag ermittelt werden. Bei bekannter *in situ* - Konzentration von Methan (die parallel aus derselben Wasserprobe bestimmt werden muß, aus der auch die Ratenmessung erfolgt) wurden nun die Methaninkorporationsrate (MIR) und die Methanoxidationsrate (MOR) nach den folgenden Formeln berechnet:

$$\text{MIR} [\text{nmol l}^{-1} \text{d}^{-1}] = \frac{\text{MARZ } ^{14}\text{C ink} [\text{dpm/d}] \times \text{in situ CH}_4 [\text{nmol/l}]}{\text{zugesezte Aktivität} [\text{dpm}]}$$

<sup>14</sup>C ink = In die Biomasse inkorporierter <sup>14</sup>C - Anteil an markiertem Methan

Bei der Berechnung der Methanoxidationsrate mußte noch zusätzlich die Wiederfundrate berücksichtigt werden, die angibt wie quantitativ das markierte Kohlendioxid ausgetrieben bzw. aufgefangen werden konnte. Zu diesem Zweck wurde zu einer Wasserprobe eine bekannte Menge an H<sup>14</sup>CO<sub>3</sub><sup>-</sup> zugegeben, nach Ansäuern als <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> ausgetrieben und die davon aufgefangene Menge zur ursprünglich zugegebenen in Relation gesetzt. Hierbei ergab sich eine Wiederfundrate von 0,9.

$$\text{MOR} [\text{nmol l}^{-1} \text{d}^{-1}] = \frac{\text{MARZ } ^{14}\text{CO}_2\text{ox} [\text{dpm/d}] \times \text{in situ CH}_4 [\text{nmol/l}]}{\text{zugesezte Aktivität} [\text{dpm}] \times \text{Wiederfundrate}}$$

<sup>14</sup>CO<sub>2</sub>ox = Zu <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> oxidiertes Anteil an markiertem Methan

Aus der Addition beider Raten ergibt sich schließlich der Gesamtumsatz an Methan in der jeweiligen Probe.

Die Umsatzraten im *Sediment* wurden in entsprechender Weise aus den Mengen des gebildeten  $^{14}\text{CO}_2$  und des assimilierten  $^{14}\text{C}$ , der *in situ* - Methankonzentration sowie der Radioaktivität des zugefügten Methans berechnet.

#### 6.4 $\text{CO}_2$ -Fixierung

Zur Bestimmung der  $\text{CO}_2$ -Fixierung, die an den untersuchten Standorten primär durch chemoautotrophe Prokaryoten erfolgt, wurden ebenfalls Radiotracer eingesetzt (bei dieser Methode wird außerdem das bei der Methanbildung und Acetogenese inkorporierte  $\text{CO}_2$  und auch der in chemoheterotrophen Prozessen festgelegte Kohlenstoff miterfaßt). Die Unterproben aus den Multicorer-Kernen wurden auf die gleiche Weise bearbeitet, wie bei der Bestimmung des Methanumsatzes im Sediment (s. Kap. 6.3.2, S. 27). Als Tracersubstanz wurden jedoch jeweils 20  $\mu\text{l}$  einer anoxischen  $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$  Lösung ( $0.73 \text{ mmol l}^{-1}$ ; spezifische Aktivität  $55 \text{ mCi mmol}^{-1}$ ) injiziert. Nach Inkubation und Zerteilung der Kerne wurden die Scheiben in Zentrifugenröhrchen überführt und 30 min bei  $4000 \times g$  zentrifugiert. Anschließend wurde zur Entfernung von überschüssigem  $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$  der Überstand verworfen, das Sediment noch einmal mit autoklaviertem Seewasser gewaschen, zentrifugiert und der Überstand erneut abgezogen. Die so bearbeiteten Proben wurden dann über 48 h bei  $60^\circ\text{C}$  getrocknet und an Bord bei  $-18^\circ\text{C}$  zwischengelagert. Im Isotopenlabor des Instituts wurde das Sediment in 2 ml  $0,1\text{M}$   $\text{H}_3\text{PO}_4$  resuspendiert, um eventuell noch adsorbierte oder in Karbonaten gebundene Aktivität zu entfernen. Danach wurde das Material erneut über 48h bei  $60^\circ\text{C}$  getrocknet. Die anschließenden Arbeitsschritte entsprechen denen, die bei Bestimmung der Menge an inkorporiertem  $^{14}\text{C}$  aus markiertem Methan durchgeführt wurden. Zusätzlich wurden noch die Zentrifugationsüberstände auf Restaktivität von partikulärem oder gelöstem  $^{14}\text{C}$  überprüft. Wenn eine solche gefunden wurde, wurde sie den zugehörigen Sedimentaktivitäten zugeschlagen. Die  $\text{CO}_2$ -Fixierungsrate errechnete sich schließlich aus dem Anteil an in die organische Sedimentfraktion inkorporierten  $^{14}\text{C}$  an der am Anfang zugesetzten Menge an  $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$  bei gegebener *in situ* - Konzentration an gelöstem anorganischen Kohlenstoff (DIC).

## 7 Mikrobielle Diversität

### 7.1 Rasterelektronenmikroskopie

Wasserproben wurden an Bord in 250 ml - PET-Flaschen abgefüllt, mit 5 ml 0,2 µm - filtriertem Formaldehyd (2% Endkonzentration) fixiert und kühl gelagert.

Sedimentproben (ca. 1 ml) wurden in 9 ml sterilfiltriertem Standortwasser aufgenommen, mit 200 µl Formaldehyd fixiert (2% Endkonzentration), vorsichtig geschüttelt und ebenfalls kühl gelagert.

Im Institut wurden die Proben später über eine Ethanol-Reihe und flüssiges CO<sub>2</sub> kritisch-Punkt-getrocknet, mit Gold/Palladium besputtert und anschließend in einem Zeiss DSM 940 Rasterelektronenmikroskop betrachtet und fotografiert.

### 7.2 Isolierung methanotropher Bakterien

Zur Isolierung aerober methanotropher Bakterien wurden zunächst Kulturen zur **Anreicherung** angesetzt. Hierbei wurde für jede Probe ein Ansatz mit Nitrat (NMS), einer mit Ammonium (AMS) und einer mit beiden Stickstoffquellen (ANMS) gefahren. Zu den in sterilen gasdichten 250 ml -Glasflaschen entsprechend angesetzten 40 ml Mineralmedium (s. Anhang Kap. 16.1, S.115) wurden an Bord 10 ml Wasserprobe (oder 0,1 - 0,5 ml Sediment) gegeben. Über ein Septum wurden dann 50 ml Luft aus dem Gasraum entnommen und durch 60 ml einer Mischung aus Methan und CO<sub>2</sub> (95:5) ersetzt. Aufgrund des durch die Mehrzugabe bedingten leichten Überdrucks konnte sich mehr Methan in der flüssigen Phase lösen. Während der bei 20°C durchgeführten Inkubation wurden die sich aufgrund methanotropher Aktivität reduzierenden Methankonzentrationen durch mehrmaligen Austausch der Gasphase wieder ausgeglichen. Positive Anreicherungen, in denen sich eine Trübung oder Kahmhaut gebildet hatte, wurden gaschromatographisch auf einen Methanverbrauch in ihrer Gas-Atmosphäre überprüft.

Die eigentliche **Isolierung** erfolgte durch Ausplattieren auf mit 1,25% hochreinem Agar verfestigtem Mineralmedium (s. Anhang Kap. 16.1, S. 115). Dabei wurden die Nährböden mit zu verschiedenen Zeitpunkten aus den Anreicherungen entnommenen Unterproben beimpft. Die Platten wurden dann in Anaerobentöpfen mit einer Luft-Methan-CO<sub>2</sub>-Atmosphäre (50:45:5) bei 30°C inkubiert. Nach 4-5 Tagen wurde Material von den entstandenen Kolonien auf neuen Platten ausgestrichen. Pro Isolat wurde anschließend jeweils eine Parallelplatte ohne

Methanzugabe inkubiert, um zu überprüfen, ob es sich wirklich um ein methanotrophes Isolat handelte.

Erfolgreich isolierte und identifizierte Methanoxidierer wurden schließlich in mit Glycerin versetztem Mineralmedium bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren.

### 7.3 *Molekularbiologische Analysen*

#### 7.3.1 *Bearbeitung der Proben*

Von den Wasserproben wurden zunächst Aliquots mit gleichen Wasservolumina durch  $0,2\ \mu\text{m}$  - Polycarbonatfilter (Fa. Poretics) filtriert und die Filter dann sofort in sterilen Cryo-Vials (Fa. Nalgene) bei  $-21^{\circ}\text{C}$  tiefgefroren. Für den späteren Transport wurden diese dann in einen mit Flüssig-Stickstoff ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) befüllten Isolierbehälter überführt. Im Heimatlabor wurden dann die Organismen mit 1,25 ml autoklaviertem PBS-Puffer (s. Anhang Kap. 17, S. 118) vom Filter gewaschen und in sterilen 1,5 ml - Reaktionsgefäßen (Fa. Roth) 30 min mit  $10.000\ \times\ g$  bei  $4^{\circ}\text{C}$  zentrifugiert (Biofuge 22R, Fa. Heraeus). Danach wurde der Puffer vorsichtig abgezogen und das entstandene Pellet in  $50\ \mu\text{l}$  DNA-freiem Wasser (Fa. Fluka) gelöst. Erfolgte die Extraktion nicht sofort, wurden die Reaktionsgefäße bei  $-21^{\circ}\text{C}$  zwischengelagert.

Von den Sedimentproben wurde jeweils Material aus den verschiedenen Kernhorizonten in sterile 2 ml - Reaktionsgefäße (Fa. Eppendorf) überführt und sofort bei  $-21^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Der spätere Transport erfolgte ebenfalls in einen mit Flüssig-Stickstoff ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) befüllten Isolierbehälter. Im Heimatlabor wurden die Proben dann bis zur Extraktion bei  $-21^{\circ}\text{C}$  gelagert.

#### 7.3.2 *DNA-Extraktion*

Je nach Art und Menge des Probenmaterials wurden verschiedene Extraktionsmethoden gewählt.

##### 7.3.2.1 **Freeze-Thaw Technik**

Die Wasserproben, die im Rahmen des Projektes HYFIFLUX II genommen wurden, waren weitgehend frei von partikulärem Material und wiesen eher geringe Zelldichten auf. Da insbesondere bei mit der HBS gewonnenen Wasserproben außerdem nur geringe Probenvolumina zur Verfügung standen, wurde mit der Freeze-Thaw Technik eine ressourcenschonende Extraktionsmethode gewählt. Bei dieser, durch mechanischen Streß bei wiederholtem Einfrieren und Auftauen bedingten, Art des Zellaufschlusses kann ein verfahrensbedingter Verlust von DNA-

Material ausgeschlossen werden. Hierbei zerstören die beim langsamen Einfrieren gebildeten Eiskristalle die Zellstrukturen, während durch das Erhitzen DNA-abbauende Enzyme inaktiviert und ein Teil der mit ihr assoziierten Proteine denaturiert werden.

Die aufbereiteten Proben wurden alternierend 10 min im Wasserbad auf 65°C erhitzt und anschließend 15 min bei -21°C tiefgefroren. Dieser Prozeß wurde insgesamt 5mal wiederholt („freeze-thaw-cycles“; TSAI & OLSON 1991, LEFF et al. 1995). Vom entstandenen Zell-Lysat wurde ohne weitere Aufreinigung direkt ein adäquates Volumen in die PCR eingesetzt.

### 7.3.2.2 CTAB-Methode

Diese bei ZHOU et al. (1996) beschriebene Methode hat sich bei der Extraktion von DNA aus im Sediment lebenden Prokaryoten bewährt und wurde daher bei der Bearbeitung der Sedimentproben aus den Projekten MAKRAN II und HYDROARC eingesetzt. Im Verlauf dieses Extraktionsverfahrens werden durch die Zugabe von Hexadecyltrimethylammoniumbromid (CTAB) zum Extraktionspuffer PCR-inhibierende Huminstoffe gebunden und entfernt.

Zunächst wurde 1 g Sediment mit 2,7 ml DNA-Extraktionspuffer und 20 µl Proteinase-K - Lösung (10 mg/ml) in sterilen 15 ml Zentrifugenröhrchen (Fa. Corning) versetzt. Diese Ansätze wurden dann in einem 37°C warmen Wasserbad für 30 min inkubiert, wobei die Röhrchen zu Beginn und dann alle 10 min kurz geschüttelt wurden.

DNA-Extraktionspuffer:

Tris/HCl	100 mM	(pH 8,0)
Na <sub>2</sub> EDTA	100 mM	(pH 8,0)
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	100 mM	(pH 8,0)
NaCl	1500 mM	
CTAB	1 %	

Anschließend wurden 300 µl 20%ige SDS-Lösung hinzugegeben und die Ansätze 2 h bei 65°C inkubiert. Wiederum wurde zu Beginn und dann in 15 min - Intervallen kurz geschüttelt. Nach 10minütiger Zentrifugation bei 6000 x g wurde der Überstand in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt. Die zurückgebliebenen Sediment-Pellets wurden noch zweimal mit 900 µl Extraktionspuffer und 100 µl SDS-Lösung für 10min wie oben beschrieben extrahiert und abzentrifugiert. Danach wurden alle Überstände vereinigt und mit dem gleichen Volumen einer Mischung aus Chloroform und Isoamylalkohol (24:1) aufgefüllt. Die entstandene Lösung wurde gevortext und zur Phasentrennung kurz zentrifugiert. Anschließend wurde die wässrige Phase in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt und die DNA durch

Zusatz von 0,6 Volumen Isopropanol ausgefällt. Die gefällte DNA wurde durch 20minütige Zentrifugation bei 16.000 x g pelletiert und nach Abziehen des Überstandes mit 500 µl kaltem 70%igem Ethanol gewaschen, dann nochmals zentrifugiert (10 min bei 16.000 x g), der Überstand verworfen und das Pellet schließlich in 100 µl DNA-freiem Wasser gelöst.

Die auf diese Weise extrahierte DNA wurde noch zusätzlich mit dem QIAamp DNA Mini Kit (s.u.) aufgereinigt.

### **7.3.2.3 QIAamp DNA Mini Kit**

Zur Gewinnung von genomischer DNA aus Anreicherungen und Isolaten (Projekt MAKRAN II) sowie als zusätzlicher Reinigungsschritt nach der CTAB-DNA-Extraktion aus Sediment (Projekte MAKRAN II und HYDROARC) wurde ein Kit der Firma QIAGEN eingesetzt. Nach dem auch für Gram-positive Bakterien geeigneten Arbeitsprotokoll werden die Zellen zunächst chemisch und enzymatisch aufgeschlossen und die freigesetzte DNA reversibel an eine Silica-Gel - Membran gebunden, danach durch Waschschrte gereinigt und abschließend mit DNA-freiem Wasser eluiert. Die so aufgereinigte DNA ist dann weitestgehend frei von allen Substanzen, die bei einem Einsatz in weiteren molekulargenetischen Verfahren störende Effekte haben könnten.

### 7.3.3 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Bei der selektiven *in vitro* - Vermehrung von DNA (SAIKI et al. 1988) wurden verschiedene Polymerasen und Cycler-Programme benutzt, um für die weiterführenden Analysen geeignete Produkte zu erhalten.

Soweit möglich wurden die robusten und einfach zu handhabenden puRe Taq Ready-To-Go PCR Beads der Firma Amersham Bioscience benutzt. Die Basiskomponenten Taq-Polymerase, Desoxyribonucleosidtriphosphate (dNTPs) sowie die Puffersubstanzen sind in einer speziellen Trägermatrix bei Raumtemperatur stabilisiert und werden in Form von Kügelchen in 500 µl - Reaktionsgefäßen geliefert. Standardmäßig wurden jeweils 1,25 µl Primer (10 pmol/µl), 2,5 µl Template und 20µl DNA-freies Wasser für eine Reaktion hinzugegeben.

Die PCR-Reaktionsansätze wurden mehrheitlich in einem PTC-150 Thermocycler der Firma MJ-Research inkubiert. Zur empirischen Ermittlung der optimalen Annealing-Temperaturen sowie bei einem Teil der Sequenzierungsreaktionen wurde auch ein PTC-200 Gradienten-Cycler desselben Herstellers eingesetzt. Um Volumenänderungen durch Verdunstung auszuschließen, wurden alle Ansätze mit hochreinem Mineralöl (Fa. Sigma) überschichtet.

#### 7.3.3.1 Standard-Amplifikation von 16S rDNA

##### *Zielregion und Primer*

Zur Amplifikation eubakterieller 16S rDNA wurden die von BODROSSY et al. (1997) eingesetzten Primer (EUB27f und EUB1492r) benutzt. Bei der selektiven Vermehrung von Archaea-16S rDNA wurde das von CASAMAYOR et al. (2001) verwendete Primer-Paar (ARC344f / ARC915r) eingesetzt.

##### Nucleotidsequenzen der verwendeten Primer

Primer:	Sequenz :
Eub27f	5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3'
Eub1492r	5'-TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T-3'
Arc344f	5'-ACG GGG YGC AGC AGG CGC GA-3'
Arc915r	5'-GTG CTC CCC CGC CAA TTC CT-3'

*Polymerase und Reaktionskomponenten*

puRe Taq Ready-To-Go PCR Beads (s. Kap. 7.3.3, S. 34)

*Temperatur-Zyklus*

Bei der Standard-Amplifikation verwendetes Cycler-Programm :

Schritt :	Temperatur :	Dauer :
1.) Anfängliche Denaturierung	94°C	2 min 25 sec
2.) Denaturierung	94°C	35 sec
3.) Annealing	T <sub>A</sub>	25 sec
4.) Elongation	72°C	D <sub>E</sub>
5.) 29-malige Wiederholung der Schritte 2.) bis 4.)		
6.) Letzte Elongation	72°C	3 min 15 sec

Primer-Paar :	Annealing-Temp: (T <sub>A</sub> ):	Elongations-Dauer (D <sub>E</sub> ):
Eub27f und 1492r	60°C	75 sec
Arc344f und 915r	64°C	60 sec

**7.3.3.2 Reamplifikation klonierter DNA***Zielregion und Primer*

Bei der Reamplifikation wurden die im Handbuch des Klonierungs-Kits (Fa. Invitrogen) angegebenen Standard-Primer M13f und T3r eingesetzt, deren Komplementärsequenzen das zu sequenzierende Insert auf dem Plasmid in geringem Abstand flankieren. Hierdurch wird eine vollständige Sequenzierung des Inserts ermöglicht.

Nucleotidsequenzen der verwendeten Primer

Primer:	Sequenz :
M13f	5'-GTA AAA CGA CGG CCA G-3'
T3r	5'-ATT AAC CCT CAC TAA AGG GA-3'

*Polymerase und Reaktionskomponenten*

puRe Taq Ready-To-Go PCR Beads (s. Kap. 7.3.3, S. 34)

*Temperatur-Zyklus*

Um sowohl eine exakte Reamplifikation als auch eine ausreichend hohe Produktausbeute zu gewährleisten, wurden zwei Cyclers-Programme miteinander kombiniert. Das Erste mit einer hohen Annealing-Temperatur sicherte hierbei die korrekte Primer-Template Hybridisierung, das Zweite mit einer niedrigeren Annealing-Temperatur diente danach der zusätzlichen Vermehrung der bereits vorliegenden, korrekt amplifizierten Produkte.

Bei der Reamplifikation klonierter DNA verwendetes Cycler-Programm :

Schritt :	Temperatur :	Dauer :
1.) Anfängliche Denaturierung	94°C	3 min 25 sec
2.) Denaturierung	94°C	35 sec
3.) Annealing	65°C	15 sec
4.) Elongation	72°C	1 min 30 sec
5.) 12-malige Wiederholung der Schritte 2.) bis 4.)		
6.) Denaturierung	94°C	35 sec
7.) Annealing	56°C	10 sec
8.) Elongation	72°C	1 min 25 sec
9.) 22-malige Wiederholung der Schritte 6.) bis 8.)		
10.) Letzte Elongation	72°C	2 min 35 sec

### 7.3.3.3 Amplifikation von funktionellen Genabschnitten

#### *Zielregion und Primer*

Für eine differenzierte genotypische Einordnung der aus den MAKRAN-Sedimenten stammenden methanotrophen Isolate innerhalb der aeroben Methanoxidierer wurde zusätzlich zur 16S rDNA ein Teil des für die partikuläre Methan-Monooxygenase (pMMO) codierenden Genabschnittes (*pmoA*) amplifiziert und sequenziert. Hierbei wurde nach Abgleich mit Datenbankreferenzen eine Kombination aus den von BODROSSY et al. 1997 (*pmoA189f*) und COSTELLO und LIDSTROM 1999 (*pmoA661r*) beschriebenen Primern gewählt.

Nucleotidsequenzen der verwendeten Primer :

Primer:	Sequenz :
<i>pmoA189f</i>	5'-GGN GAC TGG GAC TTC TGG-3'
<i>pmoA661r</i>	5'-CCG GMG CAA CGT CYT TAC C-3'

#### *Polymerase*

Für die Amplifikation der *pmoA*-Genabschnitte wurde der AccuPrime SuperMix II (Fa. Invitrogen) verwendet. Hierbei handelt es sich ebenfalls um einen Prämix von Taq-Polymerase, dNTPs und Puffer, jedoch in flüssiger Form und nur bei -20°C stabil. Er enthält jedoch zusätzlich Anti-Taq DNA Polymerase Antikörper, welche die Polymerase außerhalb ihres Temperatur-Optimums inaktivieren. Dies ermöglicht einen „Hot Start“ und erhöht so die PCR-Spezifität.

#### *Reaktionskomponenten*

Volumina der in einem 50 µl PCR-Ansatz eingesetzten Reaktionskomponenten :

Komponente :	Hersteller :	Volumen :
DNA-freies Wasser	Fluka	15 µl
Primer <i>pmoA189f</i> (10pmol/µl)	MWG Biotech	2,5 µl
Primer <i>pmoA661f</i> (10pmol/µl)	MWG Biotech	2,5 µl
AccuPrime SuperMix II	Invitrogen	25 µl
Template		5 µl

*Temperatur-Zyklus*

Für die Amplifikation wurde ein Touchdown-Programm mit zusätzlichen Zyklen bei einer niedrigeren Annealing-Temperatur kombiniert.

Bei der Amplifikation von *pmoA* verwendetes Cycler-Programm :

Schritt :	Temperatur :	Dauer :
1.) Anfängliche Denaturierung	94°C	3 min 25 sec
2.) Denaturierung	94°C	35 sec
3.) Annealing	65°C	20 sec
4.) Elongation	68°C	1 min
5.) 9-malige Wiederholung der Schritte 2.) bis 4.) mit einer Verringerung der Annealing-Temperatur um 0,5°C in jedem Zyklus		
6.) Denaturierung	94°C	35 sec
7.) Annealing	60°C	15 sec
8.) Elongation	68°C	1 min
9.) 14-malige Wiederholung der Schritte 6.) bis 8.)		
10.) Denaturierung	94°C	35 sec
11.) Annealing	57°C	10 sec
12.) Elongation	68°C	1min
13.) 9-malige Wiederholung der Schritte 10.) bis 12.)		
14.) Letzte Elongation	68°C	3 min

**7.3.3.4 Erstellung von 16S rDNA - Amplifikaten für die DGGE***Zielregion und Primer*

Bei der DGGE-PCR wurden von MUYZER et al. 1993 beschriebene Primer eingesetzt. Diese binden an für Eubakterien konservative Sequenzbereiche eines für die ribosomale 16S RNA codierenden DNA-Abschnitts (16S rDNA), welcher die variable V3-Region einschließt. In das 5'-Ende des Primers Eub341f ist eine 40 Basen lange GC-Klammer integriert, so daß letztlich ein ca. 233 Basenpaare langer DNA-Abschnitt amplifiziert wird.

Nucleotidsequenzen der verwendeten Primer :

Primer:	Sequenz :
Eub341f	5'-CCT ACG GGA GGC AGC AG-3'
Eub534r	5'-ATT ACC GCG GCT GCT GG-3'

GC-Klammer :

5'- CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG G -3'

### *Polymerase*

Um für die DGGE geeignete Amplifikate zu erhalten, wurde die Red Hot Polymerase der Firma ABgene verwendet.

### *Reaktionskomponenten*

In Anlehnung an Standard-Konzentrationen (ADVANCED BIOTECHNOLOGIES 1995, BOEHRINGER 1995) wurden die Reaktionskomponenten in folgenden Konzentrationen eingesetzt:

Konzentrationen der in einem 50 µl PCR-Ansatz eingesetzten Reaktionskomponenten :

Komponente :	Hersteller :	Endkonzentration :
DNA-freies Wasser	Fluka	
10 x Reaktionspuffer	ABgene	10 Vol%
Magnesiumchlorid	ABgene	1,5 mM
dATP	ABgene	0,2 mM
dCTP	ABgene	0,2 mM
dGTP	ABgene	0,2 mM
dTTP	ABgene	0,2 mM
Primer Eub344f-GC	MWG Biotech	0,5 µM
Primer Eub534r	MWG Biotech	0,5 µM
Red Hot <i>Taq</i> -Polymerase	ABgene	0,1 u/µl

5 µl Template

dATP = 2'-Deoxy-adenosin-5'-triphosphat

dCTP = 2'-Deoxy-cytosin-5'-triphosphat

dGTP = 2'-Deoxy-guanosin-5'-triphosphat

dTTP = 2'-Deoxy-thymidin-5'-triphosphat

*Temperatur-Zyklus*

Um die Bildung unerwünschter PCR-Nebenprodukte aufgrund von falschem Annealing der Primer zu vermeiden, wurde die Annealing-Temperatur für die Primer 5°C höher als die berechnete ( $T_m$ ) gewählt. Da bei höherer Annealing-Temperatur nur die Bindung der Primer an die 100% passende Template-Sequenz ausreichend stabil ist, erhält das korrekte Produkt bei der exponentiell verlaufenden PCR einen erheblichen Amplifikationsvorteil (DON et al. 1991).

Bei der DGGE-PCR verwendetes Cyclor-Programm :

Schritt :	Temperatur :	Dauer :
7.) Anfängliche Denaturierung	94°C	2 min 25 sec
8.) Denaturierung	94°C	35 sec
9.) Annealing	60°C	25 sec
10.) Elongation	72°C	45 sec
11.) 29-malige Wiederholung der Schritte 2.) bis 4.)		
12.) Letzte Elongation	72°C	3 min 15 sec

**7.3.3.5 Reamplifikation von DGGE-Banden***Zielregion und Primer*

Zur Reamplifikation von in denaturierenden Gradientengelen getrennten Amplifikaten wurde ein Vorwärts-Primer verwendet, der ausschließlich im Bereich der GC-Klammer optimal bindet. Durch dieses Design sollte verhindert werden, daß eine Vervielfältigung im Gel mitlaufender Template-Anteile die anschließende Sequenzierung beeinträchtigt.

Nucleotidsequenzen der verwendeten Primer :

Primer:	Sequenz :
GC95ref	5'-GTC CCG CCG CCC CC-3'
Eub534r	5'-ATT ACC GCG GCT GCT GG-3'

### *Extraktion der Amplifikate und Reamplifikation*

Der die Amplifikate enthaltende Flüssiganteil wurde mittels Zentrifugation durch ein Glasfaserfließ (Fa. Whatman) aus den ausgeschnittenen Gelfragmenten extrahiert. Das so gewonnene Material wurde dann als Template im vorangehend beschriebenen PCR-Protokoll eingesetzt.

### **7.3.4 Agarose Gel Elektrophorese**

Die Kontrolle der PCR-Produkte erfolgte durch elektrophoretische Trennung in 1 bis 2%igen Midi-Agarose - Gelen (Fa. ABgene) unter Verwendung einer horizontalen Blue Marine 100 Elektrophorese-Einheit (Fa. Serva) und 1x TBE-Puffer (s. Anhang Kap. 17, S. 118). Anschließend wurde das Gel 30 min in einer Ethidiumbromid-Lösung (0,5 mg/l Endkonzentration, Fa. Sigma) gefärbt und auf einem Transilluminator (Fa. Bachhofer) mit einer Anregung von 312 nm ausgewertet. Die Dokumentation erfolgte mit einer Sofortbildkamera der Firma Polaroid (Film Typ 667).

### **7.3.5 Denaturierende Gradienten Gel Elektrophorese (DGGE)**

#### **Methode**

Bei dieser von FISCHER und LERMAN (1979) erstmals beschriebenen molekularbiologischen Technik werden homologe doppelsträngige DNA-Abschnitte in einer mit einem denaturierenden Gradienten versehenen Gelmatrix in Abhängigkeit von ihrer Basenzusammensetzung getrennt.

In diesem Falle werden mit Hilfe der PCR erzeugte Amplifikate auf einem Polyacrylamid-Gel aufgetragen, das einen Konzentrationsgradienten von denaturierenden Chemikalien enthält (Harnstoff und Formamid). Die Denaturierungsbedingungen (Temperatur- und Denaturierungsgradient) werden so gewählt, daß die doppelsträngigen DNA-Amplifikate während der Elektrophorese partiell in Einzelstränge übergehen. Die durch dieses „Aufschmelzen“ bedingten Konformationsänderungen beeinträchtigen die elektrophoretische Mobilität, so daß partiell weiter aufgeschmolzene DNA-Amplifikate stärker im Polyacrylamid-Gel zurückgehalten werden als andere. Da das Schmelzverhalten sequenzabhängig ist, wandern DNA-Amplifikate mit unterschiedlicher Basenzusammensetzung während der Elektrophorese auch unterschiedlich weit.

Enthalten die denaturierten DNA-Fragmente gruppen- oder artspezifische Sequenzen, so steht theoretisch jede im Gradientengel getrennte Bande für einen entsprechenden Phylotyp. Unter optimalen Bedingungen ist eine Trennung auf Artniveau (MUYZER et al. 1995) bis hin zur Detektion von Änderungen einzelner Basen (FISCHER AND LERMAN 1983) möglich.

Das durch eine Erhöhung der Temperatur oder der Konzentration der denaturierenden Chemikalien bedingte Aufschmelzen doppelsträngiger DNA erfolgt nicht kontinuierlich, sondern schrittweise. Hierbei unterliegen diskrete Segmente mit einheitlichem Schmelzverhalten (Melting Domains) (MYERS et al. 1987, ABRAMS & STANTON 1992) nacheinander der Denaturierung. Während des Laufes im Gradientengel werden die DNA-Fragmente ansteigenden denaturierenden Bedingungen unterworfen, so daß Melting Domains mit zunehmend größerer Stabilität zu schmelzen beginnen. DNA-Fragmente mit Längen von mehr als 200 Basenpaaren enthalten in der Regel mehr als zwei Melting Domains. Solche längeren Fragmente bilden während der Elektrophorese verschiedene, teilweise aufgeschmolzene Intermediate, bevor sie in Einzelstränge zerfallen. Bei deutlich längeren Amplifikaten nimmt die Wahrscheinlichkeit zu, daß bei Amplifikaten von verschiedenen Templates Melting Domains mit gleichem Schmelzverhalten, jedoch an unterschiedlichen Positionen des DNA-Fragmentes auftreten. Diese Fragmente werden daher im Gradientengel nicht mehr sauber getrennt.

Die Most Stable Region (MSR) (ABRAMS & STANTON 1992) ist die Melting Domain mit der größten Stabilität, die demzufolge auch als letzte schmilzt, bevor der DNA-Doppelstrang in Einzelstränge zerfällt. Da die elektrophoretische Mobilität der Einzelstränge größer ist als die des letzten Duplex-Stadiums, aus dem sie hervorgegangen sind, laufen sie relativ schnell aus dem Gel. Demnach lassen sich DNA-Fragmente, auch wenn sie sich in der Basenzusammensetzung ihrer MSR unterscheiden, nicht zuverlässig im Gradientengel auftrennen. Dies ist besonders problematisch, wenn das untersuchte DNA-Fragment nur wenige Melting Domains enthält. Um auch Sequenzunterschiede in den MSRs mit der DGGE nachweisen zu können, werden die aufzutrennenden DNA-Fragmente künstlich mit einem mindestens 40 Basenpaare langen GC-reichen Abschnitt (GC-Clamp; MYERS et al. 1985, SHEFFIELD et al. 1989) versehen. Diese GC-Klammer wird üblicherweise in das 5'-Ende eines Primers integriert und verhindert aufgrund ihrer hohen Schmelztemperatur ein vollständiges Aufschmelzen des Amplifikates im Gradientengel.

### **Modifikationen**

Zur Erhöhung der Trennleistung wurden Doppelgradientengele (PETRI AND IMHOFF 2001) gegossen, bei denen der Denaturierungsgradient (40-64%) mit einem Acrylamidgradienten (6-8%) in gleicher Orientierung überlagert wird.

## Anwendung

Die DGGE wurde als „Fingerprinting-Technik“ für den ersten qualitativen Vergleich der Struktur von Bakteriengemeinschaften aus Umweltproben mit unterschiedlichen chemischen Randparametern eingesetzt.

## Durchführung

### *Aufbau der Gradienten-Gele*

Mit Hilfe eines GM-40 Gradienten-Mischers der Firma C.B.S.-Scientific wurden Polyacrylamid-Gele mit verschiedenen linearen Denaturierungsgradienten erzeugt. Hierzu wurden zunächst aus einer 0 und einer 100 % Denaturierungslösung (s. Anhang Kap. 18, S. 119) 2 Lösungen mit den jeweiligen Grenzkonzentrationen angesetzt. Dann wurde die Lösung mit der niedrigeren Konzentration an denaturierenden Chemikalien in die linke Kammer, die mit der höheren in die rechte Kammer des Gradienten-Mischers gegeben. Zur Initiation der Polymerisierungsreaktion wurden zu jeder der beiden Lösungen 1 Vol% 10-prozentiger Ammoniumpersulfat-Lösung (Fa. Merk) und 0,05 Vol% N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (Fa. Merk) hinzugegeben und mit einem Magnetrührer gemischt. Anschließend wurde die Verbindung zwischen den beiden Kammern hergestellt. Nach Öffnen des Auslasses an der rechten Kammer lief das Gemisch unter ständigem Rühren über einen Kunststoffschlauch durch eine Kanüle (0,9 mm Durchmesser) in das vorbereitete Gelplattensandwich.

### *Elektrophorese*

Nach einer Polymerisationszeit von 60 min wurde das Gel zunächst in dem auf 60°C geheizten Puffertank äquilibriert (0,5x TAE Puffer, s. Anhang Kap. 17, S. 118). Dann wurden die Taschen des Gels mit einer Mischung aus 24 µl PCR-Produkt und 4 µl 6x Blue Orange Dye (Fa. Promega) befüllt. Die anschließende Elektrophorese erfolgte bei 75 V in einer vertikalen Elektrophorese-Einheit DGGE 2000 der Firma C.B.S.-Scientific über 17 Stunden.

### *Färbung und Dokumentation*

Das Gel wurde 60 min in einer 1x SYBR Green - Lösung gefärbt und auf einem Transilluminator mit einer Anregung bei 312 nm (Fa. Bachhofer) ausgewertet. Der von der Firma FMC hergestellte hochsensitive DNA-Farbstoff SYBR Green ermöglicht hierbei auch eine Detektion sehr schwacher DNA-Banden im Gradientengel. Die Dokumentation erfolgte mit einer Sofortbildkamera der Firma

Polaroid (Film Typ 665). Das Negativ wurde mit einem Flachbettscanner (Fa. Umax) eingelesen und mit einer Bildbearbeitungssoftware optisch korrigiert.

### 7.3.6 Klonierung

#### **Methode**

Als Klonierung bezeichnet man die *in vitro* Neukombination von Erbgut (DNA) und deren Vermehrung in Wirtszellen. Hierbei wird zunächst der gewünschte DNA-Abschnitt in einen sich autonom replizierenden Vektor eingefügt (Ligation) und dieser dann in eine Wirtszelle eingeschleust (Transformation). Hier erstellt dieser nun eine Vielzahl von Kopien seines eigenen Genoms. Bei Zellteilung der Wirtszelle werden die replizierten Vektoren an die Tochterzellen weitergegeben. Auf diese Weise erhält man eine Kolonie genetisch identischer Zellen (Klon), in der die künstlich eingefügte genetische Information um ein Vielfaches vermehrt wurde.

Die Klonierungsexperimente wurden mit dem TOPO TA Cloning Kit der Firma Invitrogen gemäß den Anweisungen des Herstellers durchgeführt. Die Ligation der PCR-Amplifikate erfolgte hierbei in den Plasmid-Vektor pCR4-TOPO mit dem anschließend kompetente One Shot TOP10 E.coli - Zellen transformiert wurden. Der für den einzufügenden DNA-Abschnitt (Insert) vorgesehene Sequenzbereich des Plasmid-Genoms enthält ein Gen, dessen Expression zum Absterben der kompetenten E. coli führt. Durch eine erfolgreiche Insertion wird dieser Letalfaktor jedoch ausgeschaltet. Ferner vermitteln die Plasmide den erfolgreich transformierten Bakterienzellen eine Resistenz gegen die Antibiotika Kanamycin und Ampicillin, so daß durch Ausstreichen auf mit Kanamycin versetzten LB-Agar-Platten ausschließlich transformierte Zellklone mit Plasmid-Insert selektiert werden.

#### **Anwendung**

Die Klonierung wurde eingesetzt, um aus 16S rDNA - Amplifikaten Klon-Bibliotheken zu erstellen, die (mit Einschränkungen, s. Kap. 15.2, S. 98) repräsentativ für die quantitative Zusammensetzung der Artengemeinschaften in den Umweltproben sein sollten, aus denen sie hervorgegangen sind.

#### **Durchführung**

Vom gereinigten Amplifikat (QIAquick Purification Kit, Fa. Qiagen) wurde in Abhängigkeit von der Produktausbeute eine entsprechende Menge zur Ligation eingesetzt.

Standardmäßig wurde folgender Ligationsansatz verwendet:

PCR-Produkt	3 $\mu$ l
Salzlösung	1 $\mu$ l
DNA-freies Wasser	1 $\mu$ l
Vektor pCR4-TOPO	1 $\mu$ l

Die Komponenten wurden vorsichtig mit der Pipettenspitze vermischt und der Ansatz 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 2  $\mu$ l dieses Ligationsansatzes in ein Reaktionsgefäß mit kompetenten *E. coli* gegeben und wiederum vorsichtig gemischt. Nach 30minütiger Inkubation im Eisbad wurde diese Mischung für 30 sec einem Hitzeschock im 42°C heißen Wasserbad ausgesetzt und sofort wieder 2 min auf Eis gelegt. Danach wurde zur Zellsuspension 250  $\mu$ l SOC-Medium (s. Anhang Kap. 16.2, S. 117) hinzugegeben und die Kulturen 1 h unter geringen Schaukelbewegungen bei 37°C Brutschrank angezogen.

Nach dieser Regenerationsphase wurden je 2 mal 50  $\mu$ l der unverdünnten Kultur und einer 1:5 Verdünnung auf vorgewärmten LB-Kanamycin-Agarplatten (s. Anhang Kap. 16.2, S. 117) ausplattiert. Auf diese Weise sollte sichergestellt werden, daß nach der abschließenden Inkubation, insgesamt eine ausreichende Anzahl an Kolonien (mehr als 150) in geeigneter Dichte zur Verfügung stand.

Die so beimpften Platten wurden bei 37°C bis zu 20 h bzw. bis zum Erreichen einer für das Picken geeigneten Koloniegröße inkubiert. Soweit möglich wurden nach Ende der Inkubation von allen Platten insgesamt 100 repräsentative Klone gepickt. Hierzu wurde jeweils mit einer sterilen Pipettenspitze (100  $\mu$ l) vorsichtig etwas Zellmaterial abgehoben und in einem sterilen Reaktionsgefäß mit 50  $\mu$ l DNA-freiem Wasser suspendiert. Abschließend wurden diese Zellsuspension in einem Thermocycler 10 min bei 94°C erhitzt, um die Abtötung der genetisch veränderten Bakterien durch Lyse zu gewährleisten und DNA-spaltende Enzyme zu inaktivieren. Das entstandene Zell-Lysat wurde bis zur weiteren Verwendung bei -21°C tiefgefroren.

### 7.3.7 Sequenzierung

#### **Methode**

Die Sequenzierungsreaktion erfolgte durch Cycle-Sequencing nach der von Sanger (1977) beschriebenen Kettenabbruch-Methode. Bei dem PCR-ähnlichen Verfahren werden mit Hilfe der DNA-Polymerase I und unter Einsatz nur eines Primers zum zu sequenzierenden DNA-Abschnitt komplementäre Einzelstränge verschiedener

Länge erzeugt. Dies wird durch Zugabe einer geringen Menge farbmarkierter Didesoxyribonucleosidtriphosphate (ddNTPs) zum Reaktionsansatz erreicht, deren Einbau nach dem „normaler“ Nucleotide (dNTPs) zum abrupten Abbruch der Polynucleotidsynthese führt. Aufgrund der Zufälligkeit dieses Einbaus erhält man nach einer ausreichenden Anzahl an Reaktionszyklen eine Vielzahl von Einzelsträngen, die sich ihrer Länge nur um eine Base unterscheiden und am 3'-Ende jeweils ein markiertes Didesoxy-Analogon der korrespondierenden Base ihrer Matrize tragen. Diese Einzelstränge lassen sich nun in einer denaturierenden Gelmatrix gemäß ihrer Länge auftrennen. Bei unterschiedlicher Farbmarkierung der ddNTPs läßt sich schließlich die Basensequenz direkt aus der Reihenfolge ableiten, in der diese die Gelmatrix an einem festen Punkt passieren.

## Durchführung

### *Cycle Sequencing*

Bei der Sequenzierungs-Reaktion (Cycle Sequencing) eingesetzte Primer zur Sequenzierung eubakterieller (Eub-Primer) und Archaea-16S rDNA (Arc-Primer):

Primer:	Sequenz :
Eub27f	5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3'
Eub358r	5'-CTG CTG CCT CCC GTA GG -3'
Eub341f	5'-CCT ACG GGA GGC AGC AG-3'
Eub534r	5'-ATT ACC GCG GCT GCT GG-3'
Eub521f	5'-GCA GCC GCG GTA ATA CG-3'
Eub806r	5'-GGA CTA CCA GGG TAT CTA ATC C-3'
Eub784f	5'-GGA TTA GAT ACC CTG GTA GTC C-3'
Eub1182r	5'-CCT TCC TCC GGT TTA TCA C-3'
Eub1163f	5'-GTG ATA AAC CGG AGG AAG G-3'
Eub1492r	5'-TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T-3'
Arc344f	5'-ACG GGG YGC AGC AGG CGC GA-3'
Arc915r	5'-GTG CTC CCC CGC CAA TTC CT-3'

Volumina der beim Cycle Sequencing eingesetzten Reaktionskomponenten :

Komponente :	Hersteller :	Volumen :
DNA-freies Wasser	Fluka	10 $\mu$ l
Sequenzierpuffer (2,5x)		6 $\mu$ l
Primer (3,3 pmol/ $\mu$ l)	MWG Biotech	1 $\mu$ l
Template		1 $\mu$ l
Terminationsmix	Applied Biosystems	2 $\mu$ l

Temperatur-Zyklus beim Cycle Sequencing :

Schritt:	Temperatur:	Dauer:
1.) Anfängliche Denaturierung	96°C	2 min 30 sec
2.) Denaturierung	94°C	30 sec
3.) Annealing	54°C	15 sec
4.) Elongation	60°C	4 min
5.) 99-malige Wiederholung der Schritte 2.) bis 4.)		

#### *Aufreinigung der Sequenzierungsprodukte*

Um eventuelle Störungen durch noch freie markierte ddNTPs und Pufferkomponenten auszuschließen, wurden vor der anschließenden Elektrophorese die Reaktionsprodukte ausgefällt und durch Zentrifugation von den anderen Reaktionskomponenten getrennt. Hierbei wurde zunächst der Reaktionsansatz mit einer Pipette unter dem Mineralöl abgezogen und in ein neues 0,5  $\mu$ l - Reaktionsgefäß überführt. Die DNA-Fällung wurde dann im ersten Schritt mit 80  $\mu$ l 80%igem hochreinem Ethanol bei Raumtemperatur für mindestens 20 min durchgeführt. Nach Zentrifugation in einer auf 4°C gekühlten Zentrifuge (Fa. Sigma) für 25 min bei 10.000 x g wurde der Überstand vorsichtig abgezogen und 250  $\mu$ l 70%iges Ethanol hinzugegeben. Nach kurzem Vortexen fand ein zweiter Zentrifugationsschritt unter gleichen Bedingungen statt, wonach erneut der Überstand vorsichtig entfernt wurde. Es folgte nun eine 2minütige Trocknung bei 90°C im Thermocycler, um verbliebene Ethanolreste vollständig zu verdunsten. Anschließend wurde das gereinigte DNA-Pellet unter Vortexen in einem Gemisch aus 25  $\mu$ l Template Suppression Reagent (TSR, Fa. Applied Biosystems) und 20  $\mu$ l DNA-freiem Wasser gelöst. Abschließend wurde diese Lösung für 2 min auf 95°C erhitzt, kurz herunterzentrifugiert und bis zur Elektrophorese bei -21°C eingefroren.

### *Elektrophorese und Auswertung*

Die elektrophoretische Auftrennung der aufgereinigten Sequenzierungsprodukte erfolgte in einem ABI PRISM 310 Kapillar-Sequencer der Firma Applied Biosystems. Verwendet wurde eine 66 cm lange 50 µm - Kapillare mit POP6-Polymer. Die Laufzeit betrug bei 12.2 kV / 4,5 mA und einer Denaturierungstemperatur von 50°C inklusive Reinigung und Polymer-Austausch 3 h. Während der Detektion lag am Laser eine Spannung von 9 mV an. Die Signalauswertung erfolgte über die vom Hersteller mitgelieferte Software und lieferte kombinierte Chromatogramm-Sequenz-Files. Diese wurden dann mit Hilfe des Programms Seqman II der Firma DNASTAR aligned und manuell korrigiert.

## *7.4 Phylogenetische Analysen*

### *7.4.1 Datenbankvergleich*

Die aus der Sequenzierung hervorgegangen Basensequenzen wurden zunächst online (FASTA3) mit denen aus anderen Datenbanken verglichen. Hierbei liefert die Software als Ergebnis eine Liste der der Suchanfrage ähnlichsten Sequenzen. Bei hinreichenden Sequenzübereinstimmungen sind so erste Zuordnungen auf Art- (Identität größer gleich 99%) oder Gattungsebene (Identität größer gleich 98%) möglich (FOX et al. 1992, HUGHES et al. 2001, HAGSTRÖM et al. 2002). Hieraus abgeleitete Aussagen sind um so zuverlässiger, je länger die eingegebene Sequenzinformation ist.

### *7.4.2 Phylogenetische Berechnungen*

Zur Überprüfung der gewonnenen 16S rDNA - Sequenzen auf PCR-Artefakte und Sequenzierfehler wurden diese in RNA übersetzt, mit der ARB-Software (STRUNK et al. 1998) aligned und gegen nahestehende Referenzsequenzen sowie RNA-Sekundärstrukturen abgeglichen. Eine erste phylogenetische Eingruppierung erfolgte dann auf der Basis des in ARB implementierten Parsimony Algorithmus. Bei weiteren phylogenetischen Berechnungen wurden die Programme CLUSTALW und CLUSTALX (THOMPSON et al. 1994 und THOMPSON et al. 1997) sowie das PHYLIP Softwarepaket (FELSENSTEIN 1989) verwendet. Hierbei wurden Alignments, Distanzmatrizes und Neighbor-Joining Bäume mit CLUSTALX erstellt. Maximum Likelihood Consensus Bäume hingegen wurden mit den Programmen SEQBOOT, DNAML und CONSENSE aus dem PHYLIP Softwarepaket berechnet.

# Ergebnisse

## 8 Mikrobiologische und geochemische Untersuchungen in Hydrothermalfeldern des Nord-Fiji-Beckens

### 8.1 Physikalische, chemische und mikrobiologische Parameter

#### 8.1.1 Wassersäule

Bei der Erstellung von Tiefenprofilen für Salzgehalt und Temperatur mit Hilfe der Multisonde (MS) wurden an verschiedenen Stationen im Areal A (MS30, MS43 und MS55, Abb. 7) in 1900 bis 2000 m Tiefe Wasserkörper (Anomalien) entdeckt, die sich in ihren physikalischen und chemischen Eigenschaften deutlich vom dem sie umgebenden Tiefenwasser abhoben. Aus diesen Bereichen stammende Proben zeigten im Vergleich mit dem Umgebungswasser ebenfalls Auffälligkeiten in den mikrobiologischen Parametern.

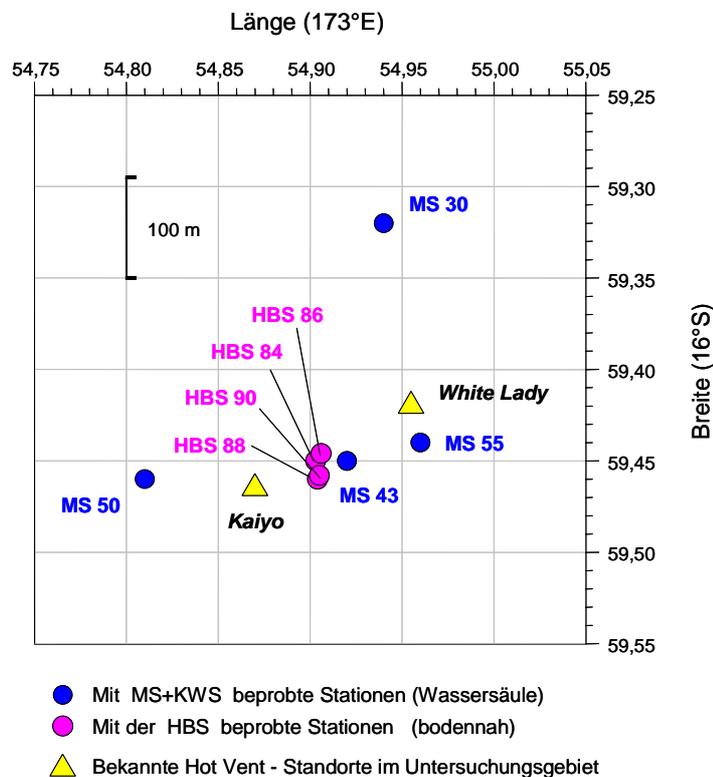
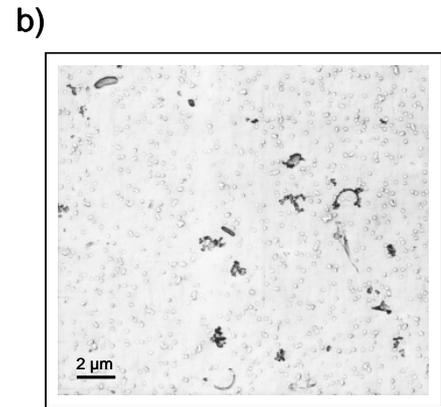
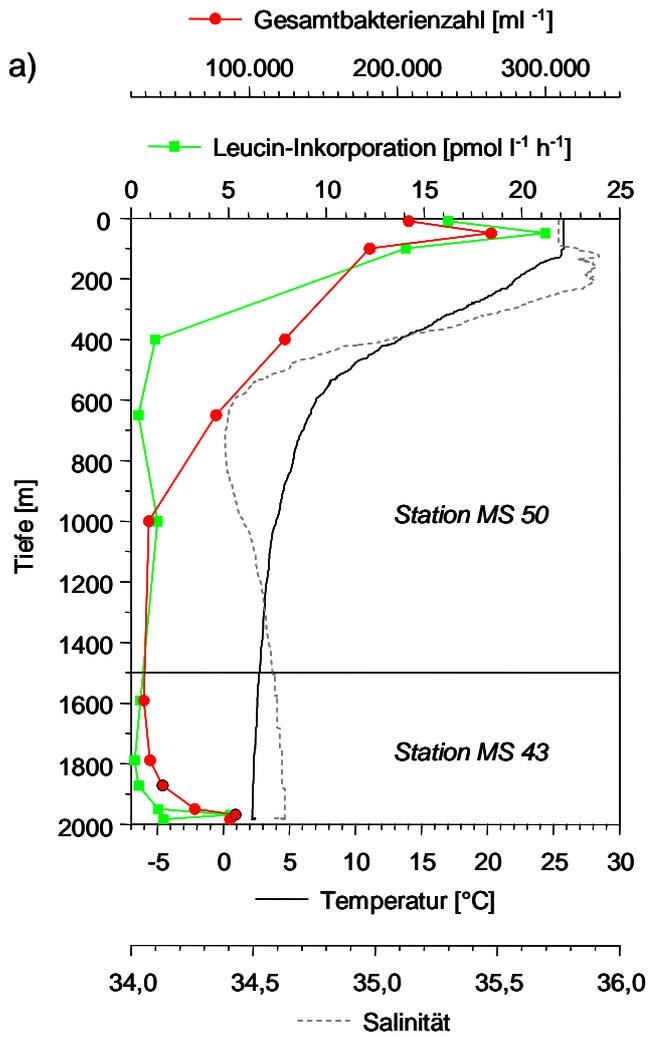


Abbildung 7. Stationskarte Areal A (Nord-Fiji-Becken).

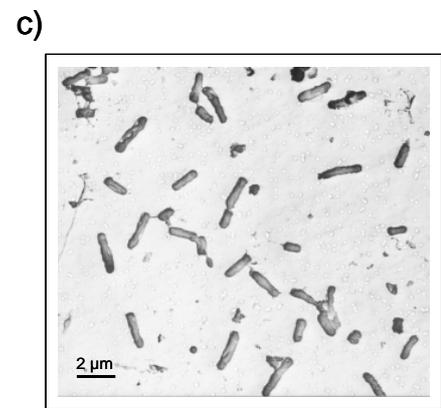
Im oberen Teil der Wassersäule (MS50, Abb. 8a) lag die Temperatur bis in 120 m Tiefe bei 26°C, fiel dann bis in 500 m Tiefe steil bis auf 8°C ab und näherte sich danach bis in 1500 m Tiefe der 3°C-Marke. Der Salzgehalt (Salinität) betrug in den oberen 100 m 35,75, in 100 bis 200 m Tiefe 35,90, fiel dann ebenfalls relativ steil bis in 500 m Tiefe auf 34,60 und erreichte in 700 m ein Minimum von 34,40. Danach folgte wieder ein leichter Anstieg bis auf 34,60 in 1500 m Tiefe. Die Gesamtbakterienzahlen lagen in Oberflächennähe bei 210.000 Zellen pro ml, stiegen auf ein Maximum von 260.000 in 50 m Tiefe und fielen dann bis in 100 m Tiefe steil auf einen Wert von 180.000 Zellen pro ml. Danach sanken die Zellzahlen kontinuierlich bis auf 3000 Zellen pro ml in 1000 m Tiefe. Die Leucin-Inkorporation, als Maß für heterotrophe bakterielle Aktivität, lag in Oberflächennähe bei 16 pmol l<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> und zeigte dann, analog zu den Zellzahlen, ein Maximum in 50 m Tiefe mit einem Produktionswert von 21 pmol l<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>. Danach erfolgte, den Verläufen von Temperatur und Salzgehalt folgend, ein steiler Abfall auf 1,3 pmol l<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>. Die Werte bis in 1000 m lagen nur wenig darüber und darunter. Im unteren Teil der Wassersäule (MS43, Abb. 8a, d und e) zeigten die Profile von Temperatur und Salzgehalt ca. 20 m über Grund Anomalien im sonst kontinuierlichen Verlauf. Hier stieg die Wassertemperatur kurzfristig um 9% von 2,2 auf 2,4°C an und der Salzgehalt sank geringfügig von 34,63 auf 34,59; auch der Sauerstoffgehalt des Wassers sank in dieser Zone von 4,99 auf 4,91 mg l<sup>-1</sup> und die Methankonzentration war mit 534 gegenüber 18 nl l<sup>-1</sup> deutlich erhöht (Abb. 9, S. 52). Im selben Bereich wiesen auch die mikrobiellen Parameter deutliche Maxima auf (Abb. 8a und e): Die Bakterienzahlen (90.600 zu 41.400 ml<sup>-1</sup>) verdoppelten sich und das mittlere Biovolumen (0,241 zu 0,035 μm<sup>3</sup>) versiebenfachte sich in Richtung auf die Anomalie. Die Sekundärproduktion (5,09 zu 0,41 pmol l<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) war hier mehr als zehnmal so hoch wie im umgebenden Tiefenwasser. In größerer Tiefe nahmen alle Werte dann wieder erkennbar ab.

**Abbildung 8** auf Seite 51. Wassersäule mit Anomalie (Stationen 43 und 50):  
Physikalische, chem. und mikrobiologische Parameter.

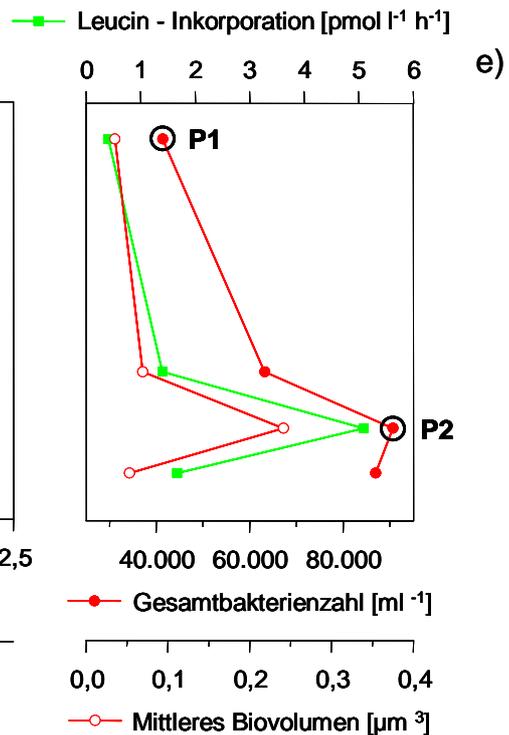
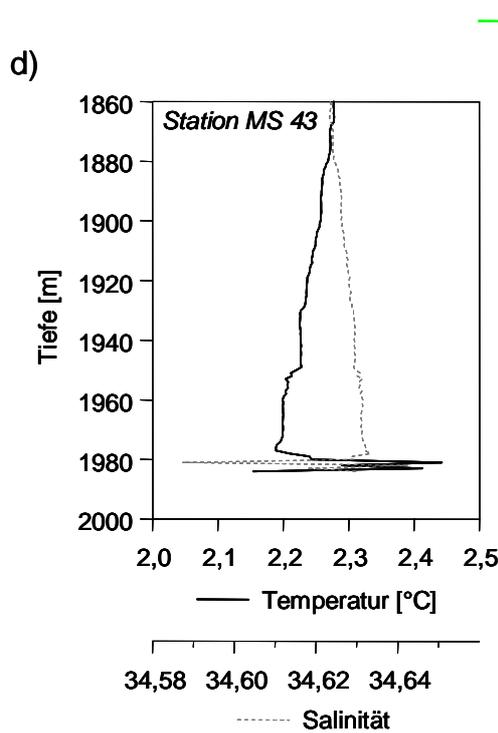
- a) Tiefenprofil der gesamten Wassersäule.
- b) und c) Rasterelektronenmikroskopische (REM) Aufnahmen aus der Anomalie (P2) und dem umgebenden Tiefenwasser (P1) (Proben in Abbildungsteil e gekennzeichnet).
- d) und e) Ausschnittsvergrößerung des Anomalie-Bereichs im unteren Teil der Wassersäule.



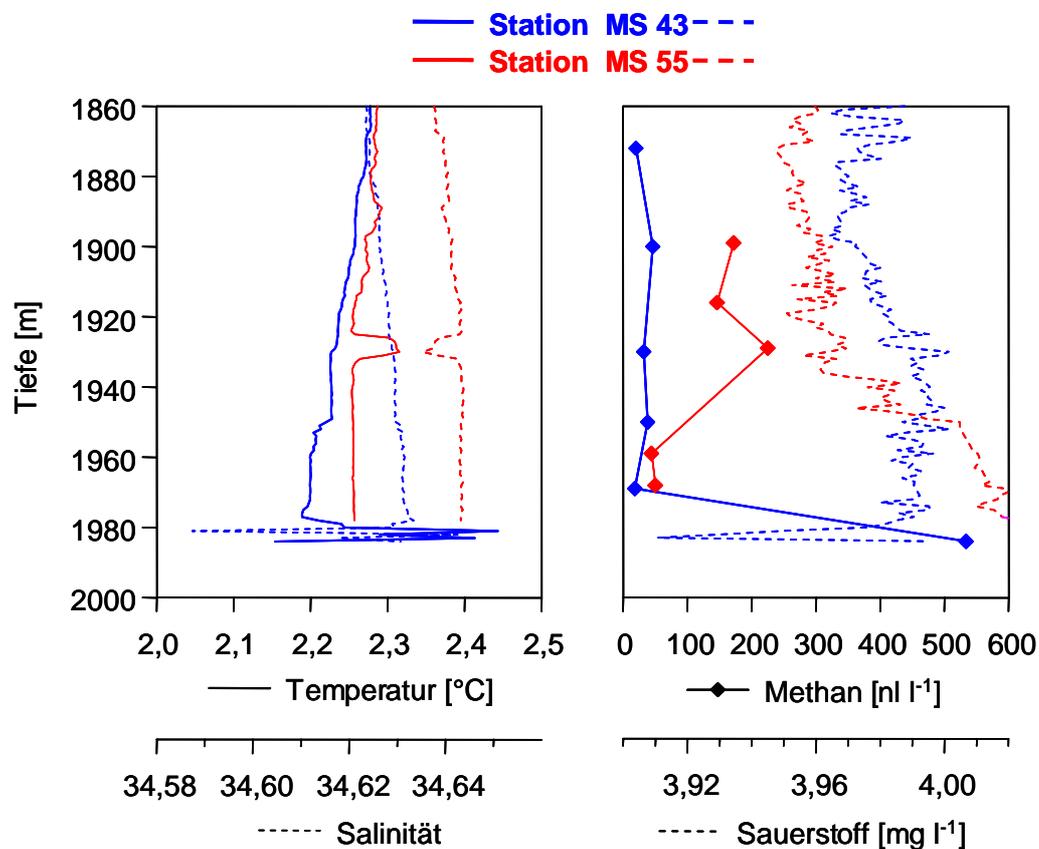
REM-Aufnahme (5000x) P1



REM-Aufnahme (5000x) P2

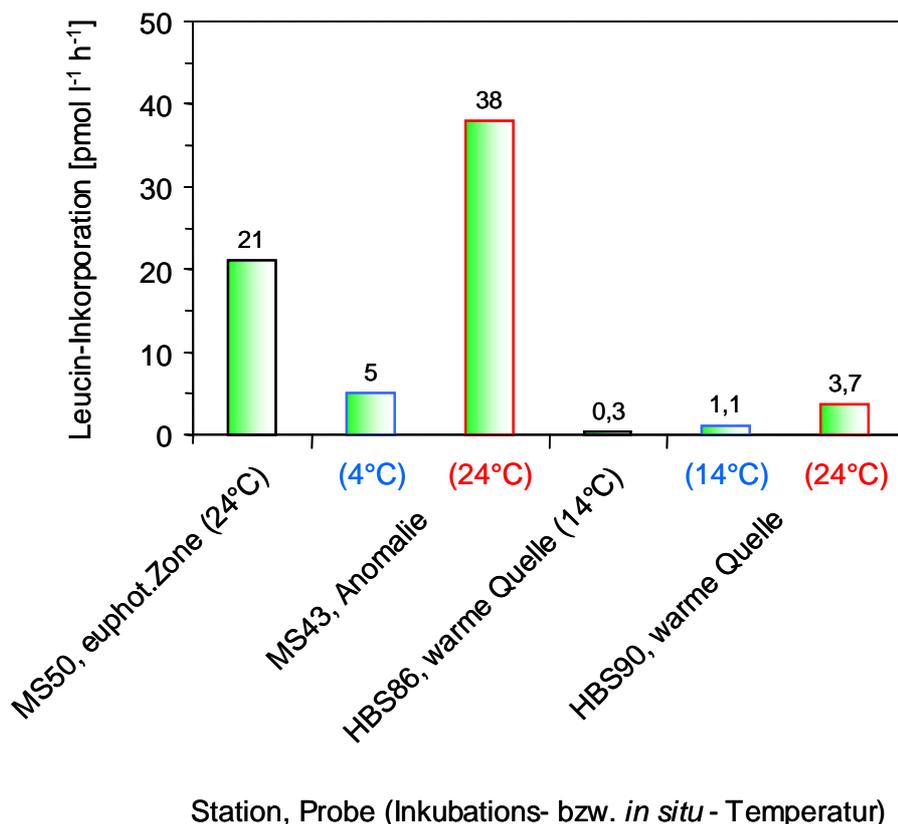


Eine weitere Anomalie fand sich im Tiefenwasser an der Station MS55. Vergleicht man die physikalischen und chemischen Parameter dieses Anomalie-Bereiches mit denen der vorangehend beschriebenen Station MS43 (Abb. 9), so fällt zunächst auf, daß sich die MS55-Anomalie rund 50 m weiter oben in der Wassersäule befindet. Außerdem ist sie weniger stark ausgeprägt: Die Wassertemperaturen stiegen hier von 2,25 auf 2,31°C. Die Temperaturdifferenz zum Umgebungswasser betrug also 0,06°C gegenüber 0,24°C an der Station MS43. Der Salzgehalt sank hier nur um 0,004 in Vergleich zu 0,04 und die maximale Methankonzentration war mit 225  $\text{nl l}^{-1}$  (10  $\text{nmol l}^{-1}$ ) nicht einmal halb so hoch wie an der Station MS43 (534  $\text{nl l}^{-1}$  bzw. 24  $\text{nmol l}^{-1}$ ). Ein deutliches Sauerstoffminimum, wie es im Anomalie-Bereich der Station MS43 auftrat, war an der Station MS55 nicht erkennbar.



**Abbildung 9.** Vergleich der Anomalien an den Stationen MS43 und MS55: Physikalische und chemische Parameter.

In einem zusätzlichen Experiment wurden aus dem Anomalie-Bereich Parallelansätze zur Bestimmung der bakteriellen Sekundärproduktion bei *in situ* und bei Oberflächentemperatur inkubiert (MS43, Abb. 10). Hierbei übertraf die Leucin-Inkorporation der bei Oberflächentemperatur inkubierten Parallelen mit  $38 \text{ pmol l}^{-1} \text{ h}^{-1}$  nicht nur die *in situ* - Temperatur - Werte ( $5 \text{ pmol l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ), sondern war sogar deutlich höher als der in Oberflächennähe bestimmte Maximalwert ( $21 \text{ pmol l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ).



**Abbildung 10.** Bakterielle Sekundärproduktion in unterschiedlichen Wasserkörpern: Inkubationsversuche bei verschiedenen Temperaturen.

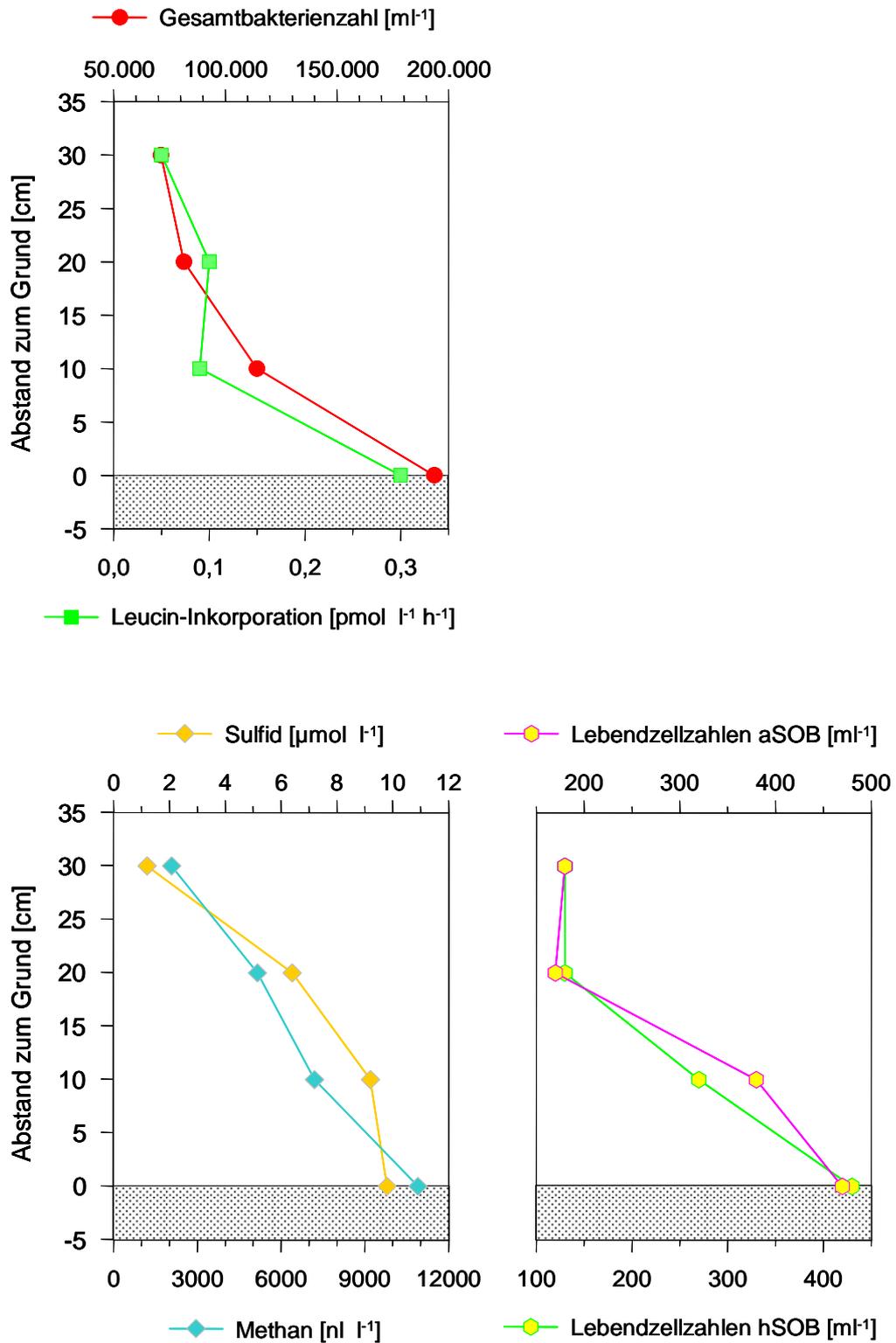
### 8.1.2 Bodennahe Wasserkörper

Mit Hilfe der Hydro-Bottom-Station (HBS) wurden in kontinuierlichen vertikalen Abständen (0, 10, 20 und 30 cm) von einer Hydrothermalquelle (Station HBS86, 2000 m Tiefe) Wasserproben genommen, an der die Fluide durch schmale Spalten im Basalt-Gestein austraten. Die an der HBS montierte Videokamera ermöglichte hierbei das gezielte Auffinden eines Standortes, an dem Wärmeschlieren im bodennahen Wasser und eine Vent-typische Makrofauna (s. Kap. 8.4, S. 64) als optische Indikatoren für eine rezente hydrothermale Aktivität erkennbar waren.

Unmittelbar an der Austrittsstelle waren die Konzentrationen von Sulfid ( $9,8 \mu\text{mol l}^{-1}$ ) und Methan ( $10.907 \text{ nl l}^{-1}$  bzw.  $487 \text{ nmol l}^{-1}$ ) am höchsten und nahmen dann mit Abstand zur Quelle kontinuierlich ab (Abb. 11). 30 cm über Grund betrug die Sulfidkonzentration nur noch  $1,2 \mu\text{mol l}^{-1}$  und die Methankonzentration war auf  $2080 \text{ nl l}^{-1}$  ( $93 \text{ nmol l}^{-1}$ ) abgesunken. In gleicher Weise verhielten sich die mikrobiellen Parameter: Die Lebendzellzahlen der auto- und heterotrophen Schwefeloxidierer sanken von Werten zwischen 470 und 430 Zellen  $\text{ml}^{-1}$  an der Quelle auf 180 und 130 Zellen  $\text{ml}^{-1}$  im 30 cm Abstand (PODGORSEK et al. 2004). Ebenso verringerten sich die Gesamtbakterienzahlen von 193.650 in Quellnähe auf 71.100 Zellen  $\text{ml}^{-1}$  in der am weitesten entfernten Probe und die Leucin-Inkorporation von  $0,30 \text{ pmol l}^{-1} \text{ h}^{-1}$  auf  $0,05 \text{ pmol l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ . Insgesamt zeigten alle Parameter innerhalb dieser relativ kurzen Distanz deutliche Veränderungen um die Faktoren 2 bis 8.

Das Zusatz-Experiment zur Auswirkung verschiedener Inkubationstemperaturen auf die bakterielle Sekundärproduktion wurde auch mit „Quellwasser“ von der Station HBS90 durchgeführt (Abb. 10, S. 53). Hierbei konnte ebenfalls ein Anstieg in der Leucin-Inkorporation von  $1,1 \text{ pmol l}^{-1} \text{ h}^{-1}$  in der bei *in situ* - Temperatur inkubierten ( $14^\circ\text{C}$ ) auf  $3,7 \text{ pmol l}^{-1} \text{ h}^{-1}$  in der bei Oberflächen-Temperatur ( $24^\circ\text{C}$ ) inkubierten Probe festgestellt werden.

Im Verhältnis zum Anomalie-Bereich an der Station MS43 ( $5 \text{ pmol l}^{-1} \text{ h}^{-1}$  bei *in situ* - Temperatur) sind die heterotrophen Aktivitäten in den quellnahen Bereichen (HBS86 u. 90) jedoch deutlich geringer.



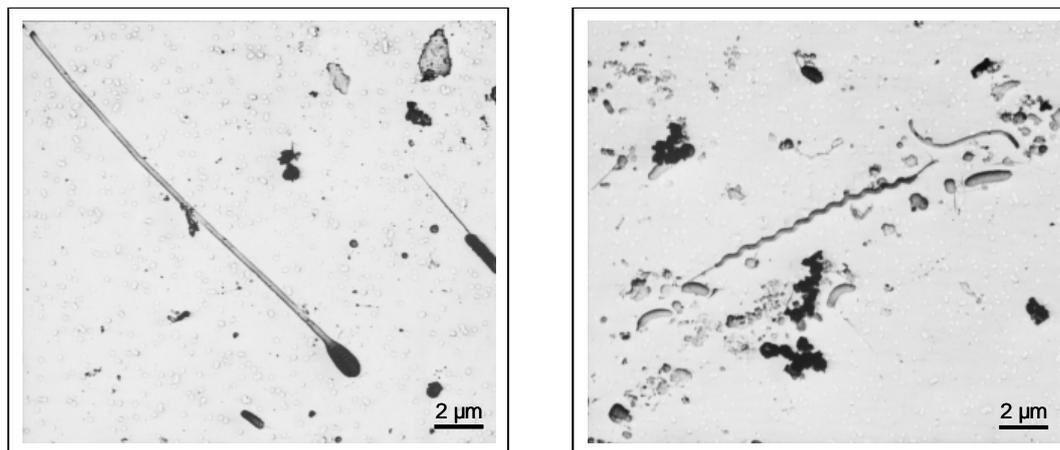
**Abbildung 11.** Gradienten chemischer und mikrobiologischer Parameter in Quellnähe (Station HBS86).

aSOB = autotrophe, hSOB = heterotrophe Schwefel-oxidierende Bakterien.

## 8.2 Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen

Die rasterelektronenmikroskopische Analyse der Wasserproben von der Station MS43 zeigte neben den erhöhten Zelldichten und -Volumina noch deutliche Unterschiede in der Morphologie zwischen den in der Anomalie und den außerhalb in der Wassersäule gefundenen Bakterien (Abb. 8b und c, S. 51): Wiesen die wenigen im umgebenden Tiefenwasser aufzufindenden Zellen noch eine gewisse Vielfalt in Bezug auf Form und Größe auf, so fanden sich in der Anomalie nur große Mengen relativ uniformer Stäbchen.

In den rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen von Wasserproben aus unmittelbarer Nähe des Fluidaustrittes an der Station HBS90, dominierten große Prokaryoten mit charakteristischen Zellformen. Unter ihnen befanden sich viele prosthecate Zellen und Spirochaeten (Abb. 12).



**Abbildung 12.** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen (Station HBS90).  
Links: Prosthecate Zelle, rechts: Spirochaete (zentral).



### 8.3 Molekularbiologische und phylogenetische Analysen

#### 8.3.1 DGGE-Diversitätsmuster

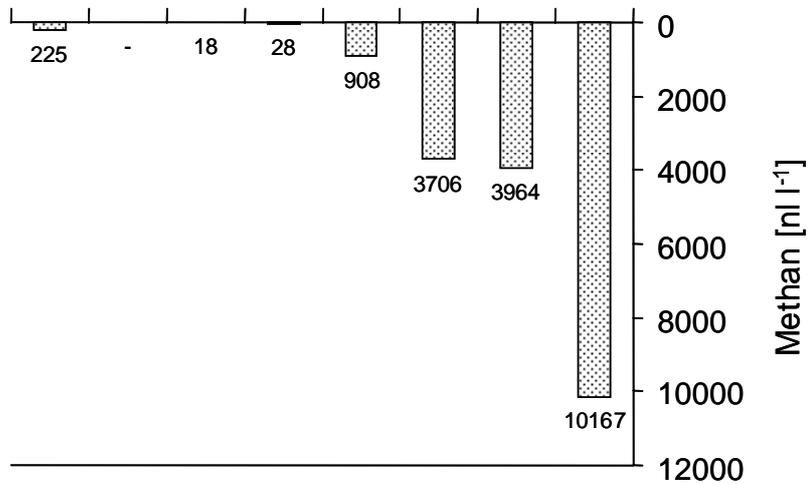
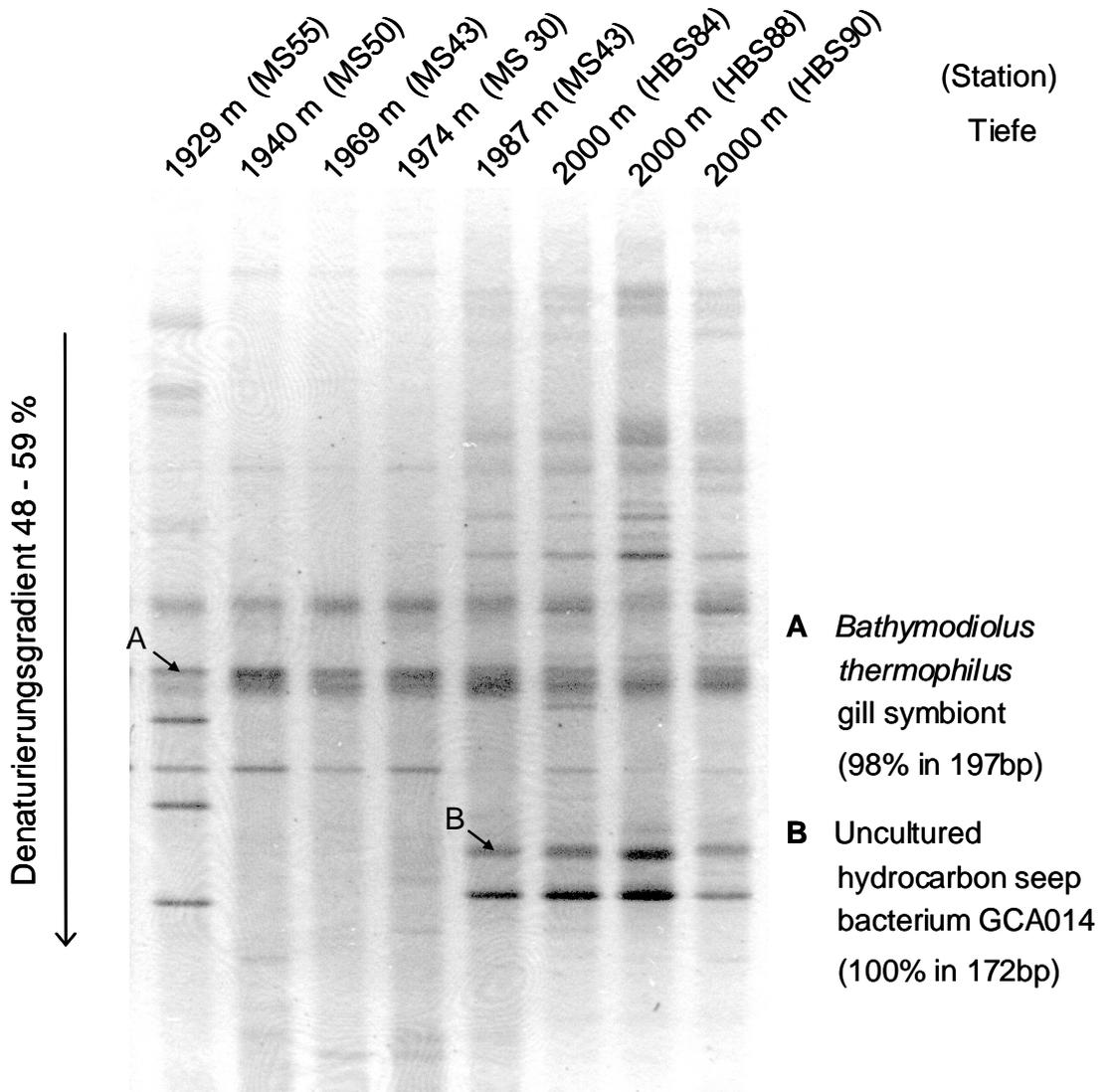
Um einen ersten Überblick über die eubakterielle Gesamtdiversität zu gewinnen, wurden 16S rDNA - Amplifikate aus unterschiedlichen Wassertiefen und von verschiedenen Standorten gemeinsam in einem DGGE-Gel aufgetrennt (Abb. 13 oben).

Verglich man die hierbei entstandenen Bandenmuster unter Berücksichtigung der jeweils gemessenen Methankonzentrationen (Abb. 13 unten) miteinander, so fiel zunächst auf, daß sich die Proben mit hohen Methangehalten deutlich von denen mit niedrigen Methangehalten unterschieden. Die Muster der Proben mit niedrigen Methanwerten, die aus verschiedenen Tiefen an den Stationen MS50, MS43 und MS30 stammten, waren nahezu identisch und zeigten nur wenige, stark ausgeprägte Banden. Die ebenfalls untereinander sehr ähnlichen Diversitätsmuster der Proben mit hohen Methanwerten, die aus einem Anomalie-Bereich (MS43) bzw. aus unmittelbarer Nähe verschiedener Fluidaustritte (HBS84, HBS88 und HBS90) genommen wurden, wiesen dagegen eine Vielzahl verschieden starker Banden auf. Das Diversitätsmuster der Probe aus der Anomalie an der Station MS55, in der ebenfalls erhöhte Methankonzentrationen gemessen worden waren, bestand zwar auch aus relativ vielen Banden, diese nahmen jedoch größtenteils deutlich andere Positionen im Gel ein als die Banden aller übrigen Proben.

Nur ein geringer Teil der im DGGE-Gel aufgetrennten DNA-Fragmente ließ sich sequenzieren. Signifikante Übereinstimmungen mit Datenbanksequenzen (FASTA) gab es nur in 2 Fällen: Eine Bande aus dem Anomalie-Bereich an der Station MS55 stammender Amplifikate zeigte über eine Sequenzlänge von 197 Basen eine 98%ige Übereinstimmung mit der Sequenz des Schwefel-oxidierenden Symbionten von *Bathymodiolus thermophilus*. Die zweite Bande von Amplifikaten, die aus einer Anomalie - Probe von der Station MS43 hervorging, stimmte über 172 Basen zu 100% mit der Sequenz eines unkultivierten „Hydrocarbon Seep - Bakteriums“ überein.

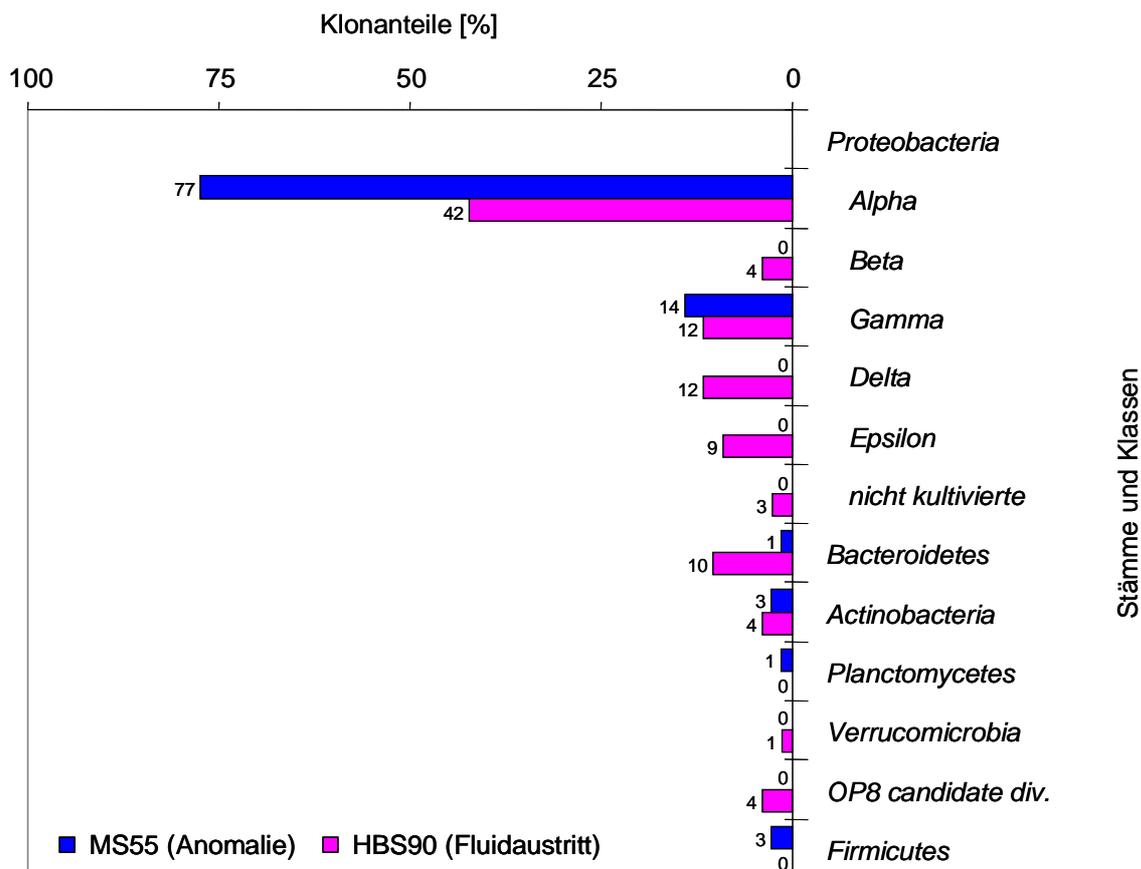
**Abbildung 13** auf Seite 59. DGGE-Bandenmuster und Methankonzentrationen ermittelt aus Proben von verschiedenen Stationen.

A und B: Nächsthähnliche Datenbanksequenzen zu sequenzierten DGGE-Banden (in Klammern: %-Sequenzübereinstimmung und -Länge).



### 8.3.2 Bakterielle Diversität in Klonbibliotheken

Aufgrund der erhöhten Methankonzentrationen und den Auffälligkeiten in ihren DGGE-Diversitätsmustern wurden die sich vom umgebenden Tiefenwasser abgrenzenden Proben MS55 1929m und HBS90 zur Erstellung von 16S rDNA Klonbibliotheken ausgewählt. Die resultierenden, durchschnittlich 800 Basen langen Klonsequenzen wurden mit Hilfe des Parsimony-Algorithmus in einen Baum mit mehr als 10000 Referenzsequenzen eingeordnet. Hierbei gingen 71 Klone von der Station MS55 (Anomalie-Bereich in Wassersäule) und 78 Klone von der Station HBS90 (Fluidaustritt) in die Berechnungen ein, die vielen verschiedenen Phylotypen und Bakteriengruppen zugeordnet wurden. Im Sinne der Fragestellung werden an dieser Stelle aus Gründen der Übersichtlichkeit nur die Anteile der jeweils zu bestimmten Gruppen gehörigen Klone von beiden Stationen graphisch gegenübergestellt (Abb. 14a-c). Als Referenz für die Einteilung und Bezeichnung der Gruppen diente Bergey's „Taxonomic outline of the procaryotic genera“ (GARRITY et al. 2001).

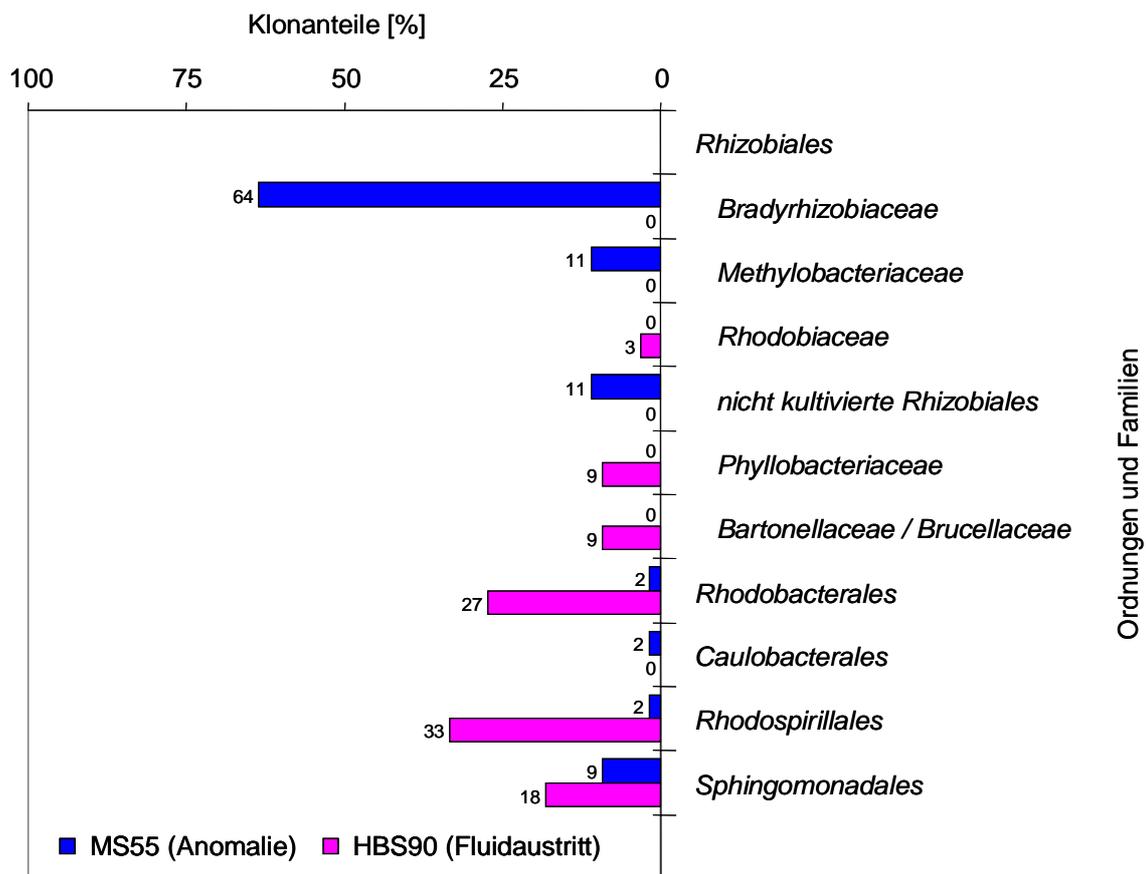


**Abbildung 14a.** Prozentuale Anteile der zu verschiedenen Stämmen und Klassen gehörenden Eubakterien-Klone (Stationen MS55 und HBS90).

Die Klonbibliotheken wurden aus eubakteriellen 16S rDNA - Amplifikaten erstellt.

Einzelheiten zu den phylogenetischen Beziehungen relevanter Klon-Gruppen werden im folgenden Text beschrieben.

Auffällig war zunächst der hohe Anteil an *Alphaproteobakterien* in beiden Proben (Abb. 14a), die an der Station HBS90 42% und an der Station MS55 sogar mehr als 75% aller Klone ausmachten. Bei detaillierter Betrachtung innerhalb der Gruppe der Alphaproteobakterien (Abb. 14b) zeigten sich jedoch deutliche Unterschiede zwischen den beiden Stationen. Während am Fluidaustritt der Station HBS 90 keine Vertreter der *Bradyrhizobiaceae* gefunden wurden, gehörten allein 64% der Alphaproteobakterien - Klone im Anomalie-Bereich der Station MS55 zu dieser Familie. Die meisten dieser Klone hatten hierbei eine mehr als 99%ige Sequenzübereinstimmung mit *Bradyrhizobium elkanii*. Die unter den Rhizobiales der Familie der *Methylobacteriaceae* zuzurechnenden Klone waren ebenfalls auf die Station MS55 beschränkt. Umgekehrt fanden sich nur am Fluidaustritt (HBS90) Vertreter aus den Familien der *Rhodobiaceae*, *Phyllobacteriaceae*, *Bartonellaceae* und *Brucellaceae*.



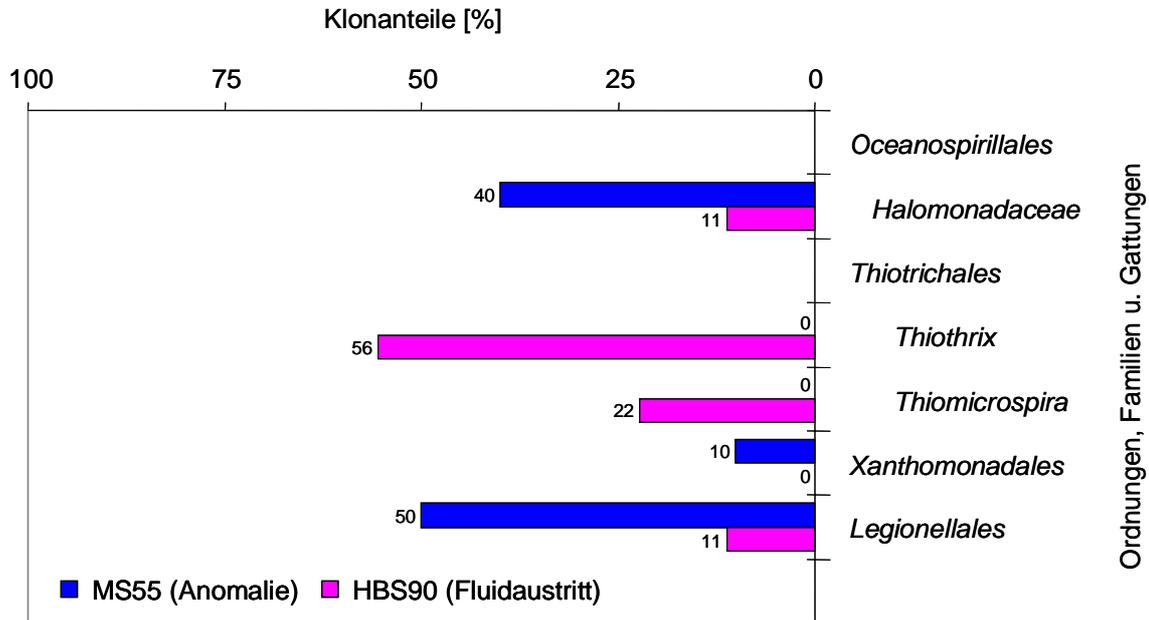
**Abbildung 14b.** Prozentuale Anteile der zu verschiedenen Ordnungen und Familien der *Alphaproteobakterien* gehörenden Eubakterien-Klone (Stationen MS55 und HBS90).

Außerdem waren hier, anders als in der Anomalie-Probe (MS55), die Ordnungen der *Rhodobacterales* und *Rhodospirillales* stark vertreten. Hierbei standen 6 Klone verschiedenen *Roseobacter*-Arten (Ordnung *Rhodobacterales*) nahe und 7 Klonsequenzen bildeten innerhalb der *Rhodospirillales* zusammen mit einem von LI et al. (1999) in Tiefsee-Sediment gefundenen Klon einen eigenen Subcluster. Bei den an beiden Stationen auftretenden *Sphingomonadales* zeigte sich eine ähnlich differenzierte Verteilung der Klone, wie sie sich schon innerhalb der Alphaproteobakterien dargestellt hatte. Während die Mehrheit der von der Station HBS90 stammenden Klone der Gattung *Rhizomonas* nahestand, zeigte die Mehrzahl der an der Station MS55 gefundenen Klone eine nähere Verwandtschaft zur Gattung *Erythrobacter*.

Vertreter der **Beta-, Delta- und Epsilonproteobakterien** waren nur direkt am Fluidaustritt an der Station HBS90 nachweisbar (Abb. 14a, S. 60). Die hier nachgewiesenen Betaproteobakterien - Klone clusterten dabei zusammen mit Sequenzen unkultivierter Bakterien, die von HUGENHOLTZ et al. (1998) in einer heißen Quelle im Yellowstone Nationalpark (USA) gefunden wurden. Unter den in die Klasse der Deltaproteobakterien fallenden Klone standen die meisten in enger Beziehung mit Sequenzen potentieller Sulfatreduzierer aus einer Klonbibliothek, die RAVENSCHLAG et al. (1999) aus arktischen (Norwegen), größtenteils anoxischen Sedimenten erstellt hatten. Weiterhin fanden sich Klone, die unmittelbar mit den Sulfat-reduzierenden Gattungen *Desulfoarculus* und *Desulfacinum* verwandt waren. Die den Epsilonproteobakterien zugerechneten Klone standen überwiegend unkultivierten Bakterien nahe, die von LI et al. (1999) in mit *Calyptogena* besiedelten Cold Seep - Sedimenten des Nankai Tiefs (Japan) gefunden wurden. Außerdem gab es Verwandtschaften zu von TESKE et al. (2002) beschriebenen Klonen aus hydrothermal beeinflussten Sedimenten des Guaymas Beckens sowie zu einem Klon aus einem Sulfat-reduzierenden Konsortium (PHELPS et al. 1998). Keine Beziehung bestand hingegen zu den von REYSENBACH et al. (2000) an Hot Vents des Mittelatlantischen Rückens in einer *in situ* - Wachstumskammer angereicherten Epsilonproteobakterien.

Die **Gammaproteobakterien** machten an beiden Stationen den jeweils zweitgrößten Anteil an Klonsequenzen aus. Bei der genaueren Betrachtung der internen phylogenetischen Beziehungen (Abb. 14c), zeigten sich jedoch erneut deutliche Unterschiede zwischen den beiden Proben. So fanden sich nur im Bereich des Fluidaustritts an der Station HBS90 thiotrophe Vertreter. Diese waren zum einen mit der Gattung *Thiothrix* (5 Klone), zum anderen mit Gruppen Schwefel-oxidierender Symbionten um die Gattung *Thiomicrospira* (3 Klone) verwandt. Von den aus dem Anomaliebreich an der Station MS55 stammenden Klonen dagegen gehörten 5 zur Gattung *Legionella* und 2 zur Gattung *Halomonas*.

Zwei andere waren mit einem Nordsee-Bakterioplankton-Klon (FUCHS unveröffentlicht) verwandt.



**Abbildung 14c.** Prozentuale Anteile der zu verschiedenen Ordnungen, Familien, Gattungen der *Gammaproteobakterien* gehörenden Eubakterien-Klone (Stationen MS55 und HBS90).

Weiterhin konnten in der Probe vom Fluidaustritt (HBS90) eine wesentlich größere Zahl *Bacteroidetes* als im Anomalie-Bereich (MS55) nachgewiesen werden (Abb. 14a, S. 60). Während es an beiden Standorten einige *Actinobakterien* gab, fanden sich in die *OP8 candidate division* (HUGENHOLTZ 1998) fallende Klone ausschließlich in Quellnähe (HBS90). Bei den nächsten Verwandten dieser Klone handelte es sich wieder um unkultivierte Bakterien aus hydrothermal beeinflussten Sedimenten des Guaymas Beckens (TESKE et al. 2002).

#### 8.4 Makrofauna und bakterielle Symbionten

Die in den beprobten Hydrothermalfeldern angetroffene sessile Makrofauna wurde im wesentlichen von zwei Arten dominiert: Der Muschel *Bathymodiolus brevior* und dem Gastropoden *Ifremeria nautiliei* (s. Abb. 15, BOROWSKI und GIERE 2001).

Beide Arten tragen in ihrem Kiemengewebe thioautotrophe Symbionten, die zu den Gammaproteobakterien gehören. Der *B. brevior* - Symbiont ist hierbei eng verwandt mit dem der Galapagos Rift - Muschel *Bathymodiolus thermophilus* und der Mid Atlantic Ridge - Muschel *B. puteoserpentis*. Das mit *I. nautiliei* vergesellschaftete Bakterium gehört zu einer Gruppe Sulfid-oxidierender Symbionten, die verschiedene Invertebraten als Wirte haben (*Lucina*, *Lucinoma*, *Solemya*, *Codakia*, *Thyasira* und *Riftia*).

Bei den 5 bis 9 cm langen Exemplaren von *B. brevior* lagen die Zellzahlen der bakteriellen Symbionten pro Wirts-Individuum zwischen  $2,6 \times 10^{11}$  und  $7,7 \times 10^{11}$ . Die Individuendichten von *B. brevior* im Bereich der beprobten Fluidaustritte bewegten sich zwischen 60 und 120 Individuen pro  $m^2$ .



**Abbildung 15.** Mit Makrofauna besiedelte Fluidaustritte im Basaltgestein (Areal A, Nord-Fiji-Becken).

Unten rechts innen: *Ifremeria nautiliei*, außen: *Bathymodiolus brevior*.

## 9 Mikrobiologische und geochemische Untersuchungen in Cold Seeps des Makran-Akkretionskeils vor der Küste Pakistans

### 9.1 Chemische und mikrobiologische Parameter

In den submarinen Bereichen der Makran-Akkretion, wo die im Untergrund fixierten Gashydrat-Schichten durch die fortschreitenden Auffaltungsvorgänge aus ihrem Stabilitätsbereich (unterhalb von 760 m Tiefe) geraten, treten mit Methan und Schwefelwasserstoff angereicherte Fluide aus dem Sediment (Gas-Seeps, s. Abb. 16).

Das untersuchte Probenmaterial stammte aus den Randbereichen solcher Seeps, wo die Methankonzentrationen im Porenwasser des Sediments zwischen 2200 und 4500 nmol l<sup>-1</sup> lagen (BERNER unveröffentlicht). Bei geringen Sauerstoff-konzentrationen im bodennahen Wasser von 0,4 - 0,5 mg l<sup>-1</sup> betrugten die Raten der aeroben Methanoxidation in der obersten Sedimentschicht bis zu 100 nmol dm<sup>3</sup> d<sup>-1</sup> (SCHMALJOHANN unveröffentlicht).

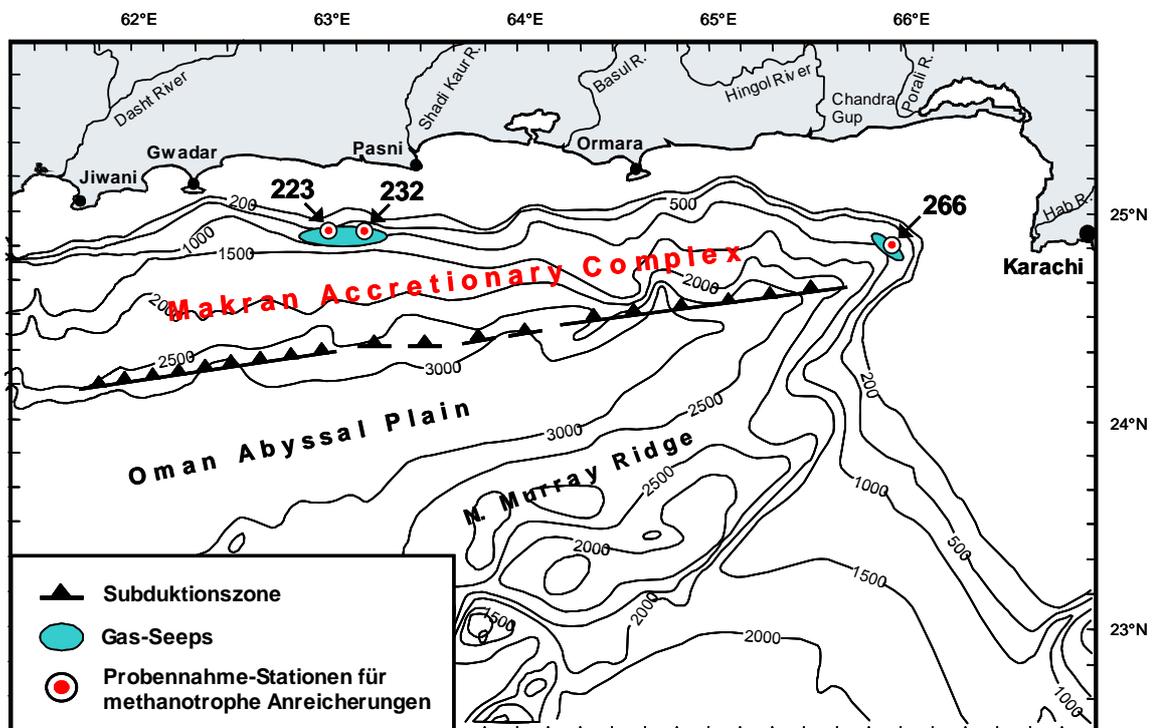


Abbildung 16. Stationskarte Makran-Akkretionskomplex (verändert nach VON RAD et al. 2000).

## 9.2 Isolierung und Identifizierung methanotropher Bakterien

Aus den oberen Zentimetern der Cold Seep - Sedimente an den Stationen 223, 232 und 266 (600 m Tiefe; Abb. 16, S. 65) konnten erfolgreich aerobe Methanoxidierer angereichert und isoliert werden. Die aus den Anreicherungen hervorgegangenen Isolate (Tab. 2) wurden mikroskopisch untersucht und aufgrund ihrer unterschiedlichen Kolonie- und Zellmorphologie zunächst in 2 Phänotypen eingeteilt (Tab. 3). Anschließend wurde eine genauere Typisierung durch die Sequenzierung ihrer 16S rDNA vorgenommen. Zur besseren Auflösung der phylogenetischen Beziehungen innerhalb der Methan-oxidierenden Bakterien wurden außerdem für eine Untereinheit der partikulären Methan-Monooxygenase codierende Genabschnitte (*pmoA*) sequenziert. Zusätzlich erfolgte eine Fettsäureanalyse unter Einbeziehung verwandter Referenzstämme der *Methylococcaceae* (STÖHR unveröffentlicht).

**Tabelle 2.** Aus Anreicherungen hervorgegangene Isolate Methan-oxidierender Bakterien

Station	Anreicherungsmedium	Isolate
223	AMS	Mi 9A, 9B, 9C
	NMS	Mi 15A
	ANMS	Mi 31A
232	AMS	Mi 2A, 2B
	NMS	Mi 23A
	ANMS	-
266	AMS	Mi 3A
	NMS	Mi 17A
	ANMS	-

Phänotypisch unterschieden sich die Kolonien der einzelnen Isolate insbesondere durch ihre Farbe (s. Tab. 3). Während die der Isolate Mi 2A, 2B, 9A und 9B rosa gefärbt waren (MAKRAN Phänotyp 1), bildeten die Isolate Mi 3A, 9C, 15A, 17A, 23A und 31A cremefarbene Kolonien (MAKRAN Phänotyp 2). Bei beiden Phänotypen handelte es sich um polar begeißelte Stäbchen, wobei die Zellen des Phänotyps 1 eher ellipsoid, die vom Phänotyp 2 eher oval geformt waren. Außerdem bildeten die Isolate vom Phänotyp 1 im Gegensatz zu denen vom Phänotyp 2 keine Dauerstadien.

**Tabelle 3.** Phänotypische Ähnlichkeiten der Makran-Isolate mit bekannten Gattungen der Methylococcaceae (BOWMAN et al. 1993)

	<i>Methylomicrobium</i>	<i>Methylobacter</i>		<i>Methylomonas</i>
		<b>Makran Typ 2</b>	<b>Makran Typ 1</b>	
<b>Beweglichkeit</b>	meist beweglich	meist unbeweglich	beweglich	meist beweglich
<b>Ruhestadien</b>	keine	Cysten	keine	Cysten
<b>Pigmentierung</b>	weiß bis farblos	braun oder gelb	rosa	rosa bis orange
<b>16:1w8c-PLFA</b>	12.1-19.0%	nicht nachweisbar	nicht nachweisbar	18.7-41.3%
<b>16:1w7c-PLFA</b>	14.1-19.9%	56.8-57.4%	51.4-62.8%	7.7-15.3%

Im genotypischen Vergleich mit 16S rDNA - Abschnitten aus verschiedenen Datenbanken (FASTA) zeigten die Sequenzen aller Isolate die größten Übereinstimmungen mit der Sequenz von *Methylobacter* sp. Strain BB5.1 (Tab. 4a). Bei den zum MAKRAN Typ 1 gehörenden Isolaten lag diese jedoch nur zwischen 93 und 94%, während die Isolate vom MAKRAN Typ 2 Sequenzidentitäten von mehr als 99% aufwiesen. Ein Vergleich der Sequenzidentitäten innerhalb der MAKRAN Typ 1 - Isolate zeigte, daß die Sequenzen der Isolate Mi 2A, 2B und 9B nahezu identisch waren, jedoch nur zu 98% mit der des Isolates Mi 9A übereinstimmten.

**Tabelle 4a.** Genotypische Ähnlichkeiten der Makran-Isolate mit bekannten 16S rDNA - Sequenzen im Datenbank-Vergleich (FASTA)

Isolat	Typ	Nächstähnliche Sequenz	%-Identität
<b>2A</b>	<b>1</b>	<i>Methylobacter</i> sp. Strain BB5.1	<b>94,24</b>
<b>2B</b>	<b>1</b>	<i>Methylobacter</i> sp. Strain BB5.1	<b>94,17</b>
<b>3A</b>	<b>2</b>	<i>Methylobacter</i> sp. Strain BB5.1	<b>99,36</b>
<b>9A</b>	<b>1</b>	<i>Methylobacter</i> sp. Strain BB5.1	<b>93,36</b>
<b>9B</b>	<b>1</b>	<i>Methylobacter</i> sp. Strain BB5.1	<b>94,20</b>
<b>9C</b>	<b>2</b>	<i>Methylobacter</i> sp. Strain BB5.1	<b>99,86</b>
<b>15A</b>	<b>2</b>	<i>Methylobacter</i> sp. Strain BB5.1	<b>99,79</b>
<b>17A</b>	<b>2</b>	<i>Methylobacter</i> sp. Strain BB5.1	<b>99,44</b>
<b>23A</b>	<b>2</b>	<i>Methylobacter</i> sp. Strain BB5.1	<b>99,86</b>
<b>31A</b>	<b>2</b>	<i>Methylobacter</i> sp. Strain BB5.1	<b>99,79</b>

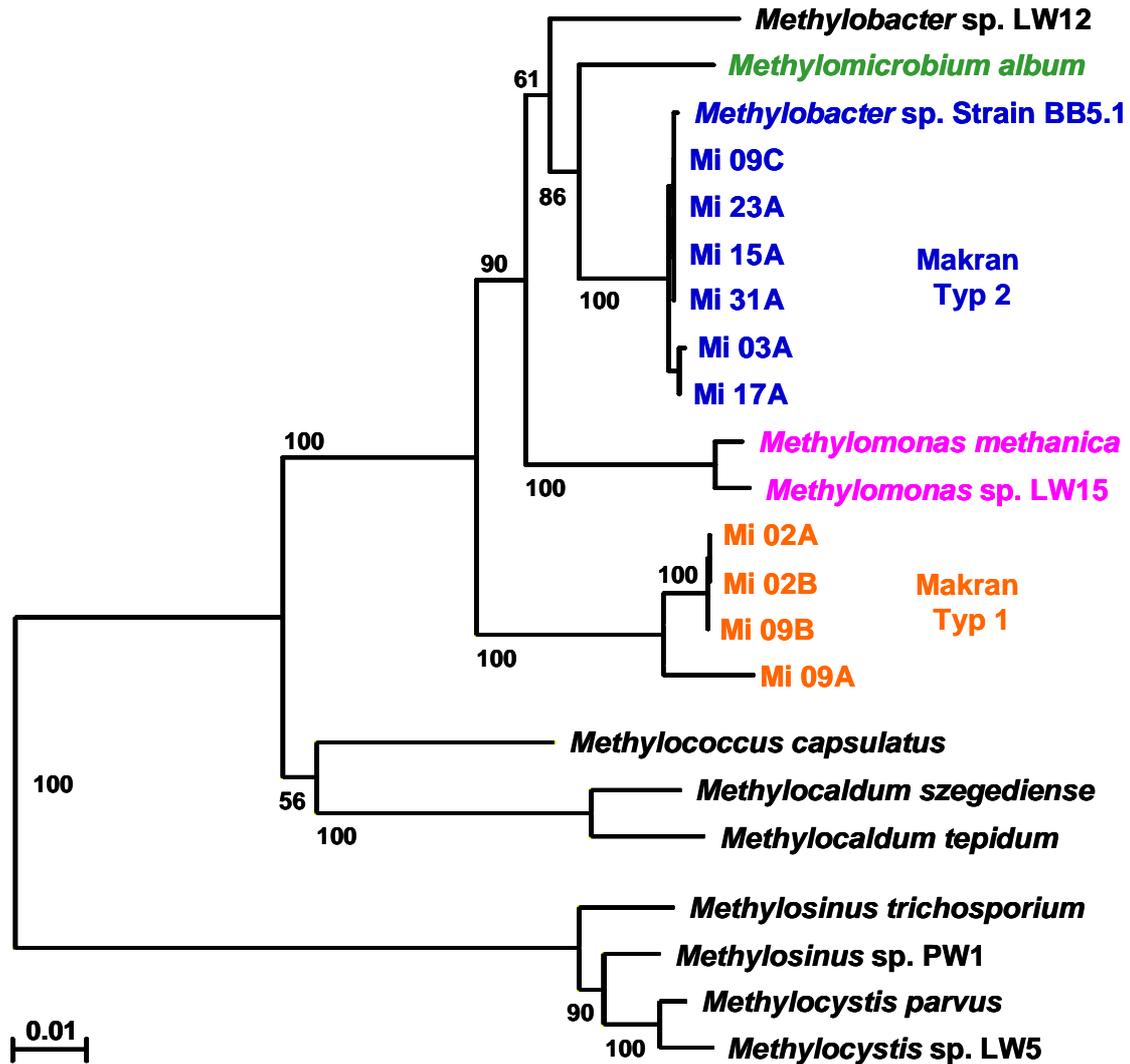
Beim Datenbankvergleich der ermittelten *pmoA*-Sequenzen (Tab. 4b) wurden die Unterschiede zwischen Makran Typ 1 und Typ 2 - Isolaten noch deutlicher. Während die *pmoA*-Sequenzen der Isolate von Typ 2 zu 99,8 - 100% mit der von *Methylobacter* sp. Strain BB5.1 identisch waren, lagen die Identitäten der Typ 1 - *pmoA*-Sequenzen zu denen der nächstverwandten bei unter 86%. Betrachtete man die Ähnlichkeiten der Typ 1 - *pmoA*-Sequenzen untereinander, so waren die der Isolate Mi 2B und 9B nahezu identisch. Die Identitäten zwischen den Sequenzen der übrigen Isolate lagen unter 95%. Wie bereits im internen Vergleich der 16S rDNA - Sequenzen zeigte auch hier die *pmoA*-Sequenz des Isolates Mi 9A die geringsten Similaritäten (unter 91%).

**Tabelle 4b.** Genotypische Ähnlichkeiten der Makran-Isolate mit bekannten *pmoA* - Sequenzen im Datenbank-Vergleich (FASTA)

Isolat	Typ	Nächstähnliche Sequenz	%-Identität
2A	1	Uncultured bacterium AB064370	85,84
2B	1	<i>Methylomonas</i> sp. LW15	84,74
3A	2	<i>Methylobacter</i> sp. Strain BB5.1	99,77
9A	1	Uncultured bacterium AB064370	85,93
9B	1	<i>Methylomonas</i> sp. LW15	84,56
9C	2	<i>Methylobacter</i> sp. Strain BB5.1	100
15A	2	<i>Methylobacter</i> sp. Strain BB5.1	100
17A	2	<i>Methylobacter</i> sp. Strain BB5.1	100
23A	2	<i>Methylobacter</i> sp. Strain BB5.1	99,77
31A	2	<i>Methylobacter</i> sp. Strain BB5.1	100

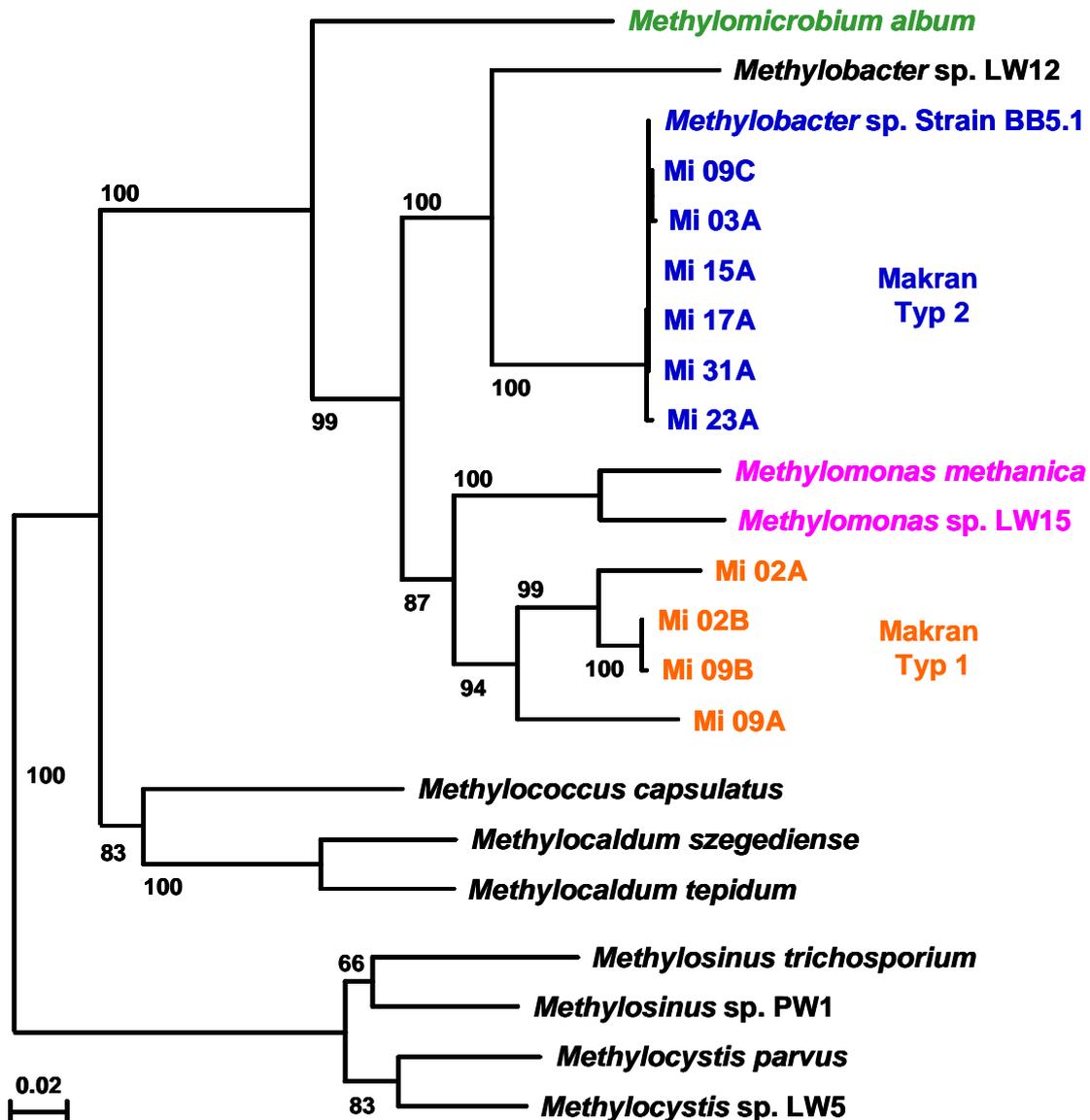
In den nachfolgenden phylogenetischen Analysen unter Zuhilfenahme geeigneter Referenzsequenzen und Berechnungsalgorithmen, wurden die MAKRAN Typ 2 - Isolate ebenfalls *Methylobacter* sp. Strain BB5.1 nahegestellt, wogegen die Isolate vom MAKRAN Typ 1 nur entfernt mit den anderen Typ I Methanotrophen zusammen clusterten (Abb. 17). Eine ähnliche Topologie fand sich bei der graphischen Umsetzung der Ergebnisse derselben Analysen mit den entsprechenden *pmoA*-Sequenzen (Abb. 18, S. 70). Auf *pmoA*-Ebene stand der MAKRAN Typ 1 jedoch den Referenzen der Gattung *Methylomonas* näher.

Beim abschließenden Vergleich der Fettsäuremuster von für Methanoxidierer charakteristischen Lipiden waren die Muster der MAKRAN Typ 1 - Isolate jedoch denen der Gattung *Methylobacter* am ähnlichsten. Beide zeichneten sich hierbei durch hohe Anteile von 16:1w7c- und das Fehlen von 16:1w8c-Fettsäuren aus (s. Tab. 3, S. 67).



**Abbildung 17.** Phylogenetische Einordnung der methanotrophen Makran-Isolate auf der Basis ihrer 16S rDNA - Sequenzen.

Die durchschnittliche Länge der in die Berechnungen eingegangenen Sequenzen beträgt 1400 Basen. Die graphische Darstellung beruht auf der Analyse des Alignments mit Hilfe des Neighbor Joining - Algorithmus. Der Maßstab gibt die Zahl der Substitutionen pro Sequenz-Position als phylogenetische Distanz wieder. Die Konfidenz der Baumstruktur ist durch Bootstrap-Werte (in Prozent) angegeben. Diese basieren auf 1000 Bootstrap-Wiederholungen.



**Abbildung 18.** Phylogenetische Einordnung der methanotrophen Makran-Isolate auf der Basis von für die partikuläre Methan-Monooxygenase codierenden Genabschnitten (*pmoA*).

Die durchschnittliche Länge der in die Berechnungen eingegangenen Sequenzen beträgt 400 Basen. Die graphische Darstellung beruht auf der Analyse des Alignments mit Hilfe des Neighbor Joining - Algorithmus. Der Maßstab gibt die Zahl der Substitutionen pro Sequenz-Position als phylogenetische Distanz wieder. Die Konfidenz der Baumstruktur ist durch Bootstrap-Werte (in Prozent) angegeben. Diese basieren auf 1000 Bootstrap-Wiederholungen.

## 10 Diversität und Aktivität von Prokaryoten-Gemeinschaften in den Sedimenten der Bransfield Straße (Antarktis)

### *Anmerkung*

Um die jeweiligen Analysen durchführen zu können, wurden die mit dem Multicorer gewonnenen Sedimentkerne zuerst in Scheiben geschnitten, und diese dann als Ganzes weiterverarbeitet. Die im folgenden beschriebenen Daten beziehen sich demzufolge nicht auf eine distinkte Sedimenttiefe, sondern immer auf einen Sedimenthorizont. Zur Verbesserung des Textverständnisses wurde jedoch in Teilen die mittlere Tiefe stellvertretend für die einzelnen Sedimenthorizonte abgegeben (Tab. 5), zumal sich diese Tiefenangaben auch in den graphischen Darstellungen (Abb. 19a-f, S. 73) wiederfinden.

**Tabelle 5.** An der Station 32-MUC untersuchte Sedimenthorizonte

Horizont [cm]	Bezeichnung	Mittl. Tiefe [cm]
0 - 1	HA1	0,5
1 - 2	HA2	1,5
2 - 3	HA3	2,5
3 - 4	HA4	3,5
<b>4 - 6</b>	<b>HA5</b>	<b>5,0</b>
6 - 8	HA6	7,0
<b>8 - 10</b>	<b>HA7</b>	<b>9,0</b>
10 - 12	HA8	11,0
<b>12 - 15</b>	<b>HA9</b>	<b>13,5</b>
15 - 18	HA10	16,5
18 - 21	HA11	19,5

### 10.1 Physikalische und chemische Parameter

Das am Kraterrand von Hook Ridge beprobte Sediment (Station 32-MUC, 1042 m Tiefe) wies an seiner Oberfläche mit 3,8°C eine gegenüber dem meist wenige Zehntel über 0°C kalten Umgebungswasser eine deutlich erhöhte Temperatur auf. Die pH-Werte im Porenwasser sanken von 6,6 an der obersten Sedimentschicht auf 5,1 in 19,5 cm Tiefe.

Sulfid (Abb. 19a) erreichte maximale Konzentrationen in 19,5 cm Sedimenttiefe ( $10,1 \mu\text{mol l}^{-1}$ ) und in der Oberflächenschicht ( $7,1 \mu\text{mol l}^{-1}$ ), während in 7 und 13,5 cm Sedimenttiefe jeweils kein Sulfid nachgewiesen werden konnte. Das Sulfatprofil (Abb. 19b) wies einen in 5 - 11 cm Tiefe unterbrochenen Gradienten auf: Im oberen Teil von 0,5 bis in 3,5 cm Sedimenttiefe nahmen die Sulfatkonzentrationen von 29 auf  $27 \text{ mmol l}^{-1}$  ab, verblieben dann zunächst bei Werten um  $27 \text{ mmol l}^{-1}$  und sanken im unteren Teil des Gradienten (von 13,5 bis in 19,5 cm) von 27 auf  $25 \text{ mmol l}^{-1}$ .

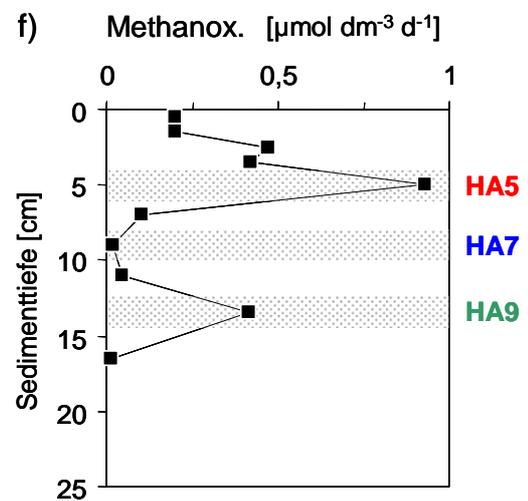
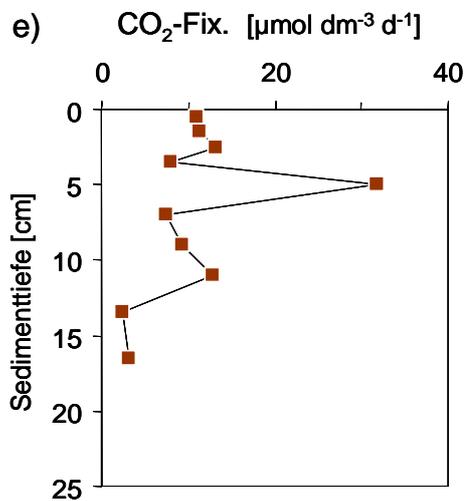
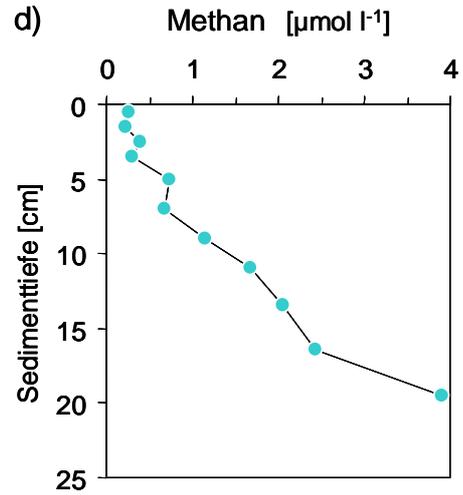
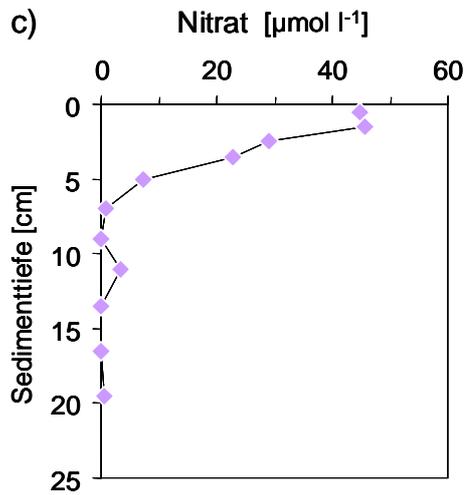
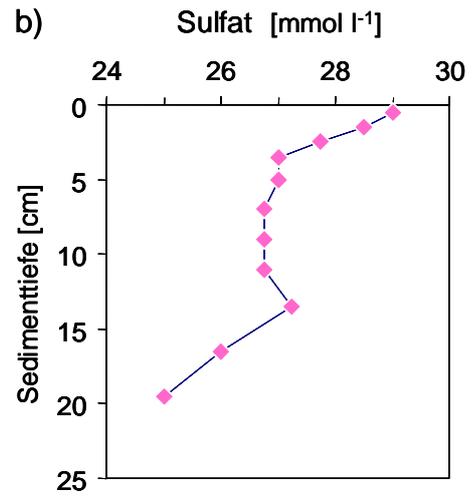
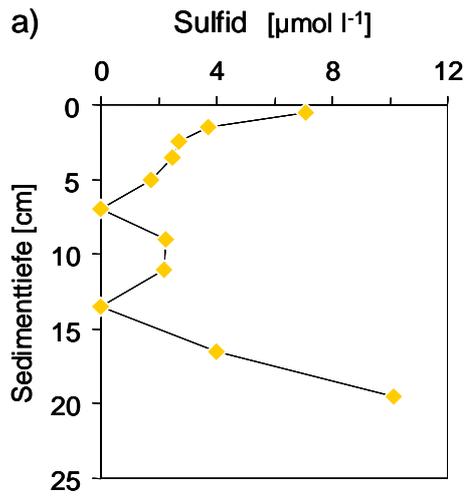
Der Methangehalt im Sediment (Abb. 19d) hingegen stieg von Werten um  $0,3 \mu\text{mol l}^{-1}$  in Oberflächennähe relativ kontinuierlich auf  $3,9 \mu\text{mol l}^{-1}$  in 19,5 cm Tiefe. Die Nitratkonzentrationen (Abb. 19c) schließlich, mit Werten um  $45 \mu\text{mol l}^{-1}$  nahe der Sedimentoberfläche, sanken in einem steilen Gradienten auf  $1 \mu\text{mol l}^{-1}$  in 7 cm Tiefe und hielten sich bis in 19,5 cm auf niedrigem Niveau.

### 10.2 Mikrobiologische Parameter

Sowohl die mikrobielle  $\text{CO}_2$ -Fixierung (Abb. 19e) als auch die mikrobielle Methanoxidation (Abb. 19f) zeigten in 5 cm Sedimenttiefe deutliche Maxima, die Höchstwerte betragen hier  $32 \mu\text{mol dm}^{-3} \text{ d}^{-1}$  bzw.  $0,9 \mu\text{mol dm}^{-3} \text{ d}^{-1}$ . Während bei der  $\text{CO}_2$ -Fixierung mit zunehmender Tiefe kein auffälliger Aktivitätsanstieg mehr zu verzeichnen war, wies die Methanoxidation nach minimalen Raten in 9 cm ( $0,02 \mu\text{mol dm}^{-3} \text{ d}^{-1}$ ) ein zweites wenn auch weniger ausgeprägtes Maximum ( $0,4 \mu\text{mol dm}^{-3} \text{ d}^{-1}$ ) in 13,5 cm Sedimenttiefe auf.

**Abbildung 19** auf Seite 73. Tiefenprofil chemischer (a-d) und mikrobiologischer Parameter (e-f) im Sediment an der Station 32-MUC.

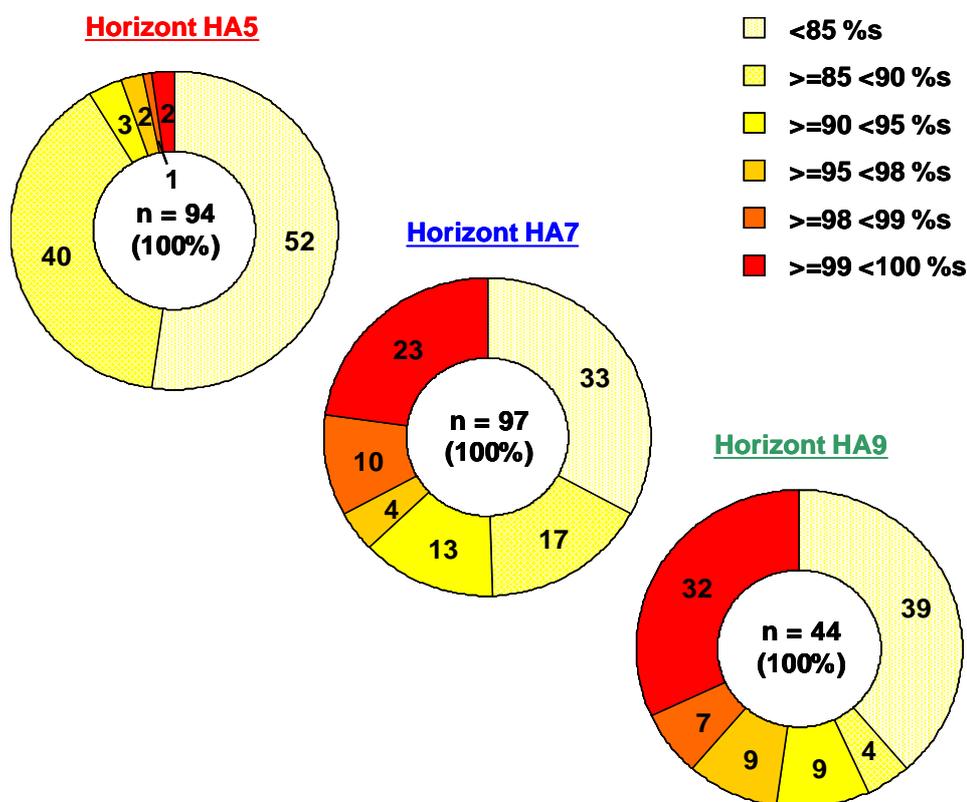
In Abbildung f) sind die für die Klonierungsexperimente ausgewählten Sedimenthorizonte gekennzeichnet.



### 10.3 Diversität der Archaea-Gemeinschaften

Um im Sediment vorhandene Gruppen von Archaea zu identifizieren, die potentiell an dem gemessenen anaeroben Methanumsatz beteiligt sein könnten, wurden zunächst die Sedimenthorizonte mit der höchsten (HA5) und niedrigsten Methanoxidationsrate (HA7) zur Analyse ausgewählt. Zusätzlich wurde eine Probe aus der Zone bearbeitet, in welcher der zweite Aktivitäts-Peak lag (Horizont HA9).

Zur Ermittlung der genetischen Diversität in diesen Proben wurden Klonierungsexperimente mit Archaea - 16S rDNA Amplifikaten durchgeführt. Beim Vergleich der resultierenden Klonsequenzen mit Referenzen aus entsprechenden Datenbanken (FASTA) ließ sich von aus den Sedimenthorizonten HA7 und 9 gewonnenen Klonen mindestens ein Drittel auf Art- oder Gattungsebene zuordnen (Abb. 20). Von den aus dem Horizont HA5, dem Sedimenthorizont mit der höchsten „methanotropen Aktivität“, hervorgegangenen Klonsequenzen waren es weniger als 5%, wobei der überwiegende Teil Sequenzidentitäten von unter 90% aufwies. Alle Sequenzen mit signifikanten Ähnlichkeiten zu denen der Hook Ridge - Klone stammten von unkultivierten Archaea bzw. Archaea-Klonen (s. Anhang Kap. 19.2).



**Abbildung 20.** Prozentuale Anteile der aus den verschiedenen Sedimenthorizonten HA5, HA7 und HA9 an der Station 32 MUC stammenden Archaea-Klone unter Berücksichtigung ihrer Ähnlichkeit zu bekannten Sequenzen [%s].

Die Einordnung in einen phylogenetischen Zusammenhang erfolgte auf der Basis verschiedener Berechnungsalgorithmen. Die zunächst angewandte Parsimony Prozedur faßte den größten Teil der Klone (211 von 225 sequenzierten) zu 6 Klon-Clustern zusammen, wobei die Cluster HA-ARC-01, 02 und 03 den Euryarchaeota, die Cluster HA-ARC-04, 05 und 06 hingegen den Crenarchaeota zugeordnet wurden (Abb. 21a, S. 77). Durch die zusätzliche Anwendung Bootstrap-gestützter Berechnungsverfahren (Neighbor Joining und Maximum Likelihood) auf ausgewählte Klon- und Referenzsequenzen wurde in einem zweiten Tree (Abb. 21b, S. 78) die Topologie des Parsimony - Primärbaumes bestätigt.

Der Klon-Cluster HA-ARC-03 gruppierte sich hierbei zur Klasse der *Thermoplasmata* und stand dort einer Gruppe von Klonen pelagischer Euryarchaeota aus verschiedenen Meeresgebieten nahe (Marine Group II: DELONG 1992, FUHRMAN AND DAVIS 1997, MASSANA et al. 1997). Die Cluster HA-ARC-01 und 02 ließen sich mit von „Smoker-Schloten“ im Izu-Ogasawara Areal vor Japan stammenden Klon-Clustern (DHVE3, 4, und 6) in der von TAKAI und HORIKOSHI 1999 postulierten Gruppe II der Deep-Sea Hydrothermal Vent Euryarchaeota zusammenfassen. Die Klone des Crenarchaeota-Cluster HA-ARC-06 reihten sich mit aus Tiefsee-Sedimenten des Nordwest-Atlantiks stammenden Klonen in die Marine Benthic Group B ein (VETRIANI et al. 1999). Diese ist weitestgehend kongruent mit der von TAKAI und HORIKOSHI 1999 beschriebenen Deep-Sea Archaeal Group (DSAG). Im Gegensatz dazu ließen sich die Cluster HA-ARC-04 und 05 keiner bisher definierten Gruppe zuordnen.

Faßt man Klone mit über 99% Sequenz-Identität zu Phylotypen zusammen (HUGENHOLTZ et al. 1998), enthielt der Cluster HA-ARC-01 59 Phylotypen, während die übrigen Cluster auf lediglich 2 - 4 Phylotypen begrenzt waren (Tab. 6).

**Tabelle 6.** Anteile der zu den verschiedenen Clustern gehörenden Archaea-Klone in den beprobten Sedimenthorizonten und Anzahlen der Phylotypen pro Cluster

Archaea-Cluster	Klon-Sequenzen aus Horizont						Klone total	Phylotypen total
	HA5		HA7		HA9			
	absolut	%	absolut	%	absolut	%		
HA-ARC-01	79	90	37	41	11	33	127	59
HA-ARC-02	5	6	6	7	1	3	12	4
HA-ARC-03	1	1	5	6	4	12	10	2
HA-ARC-04	3	3	8	9	2	6	13	3
HA-ARC-05	0	0	12	13	4	12	16	2
HA-ARC-06	0	0	22	24	11	33	33	2
Summe	88		90		33		211	72

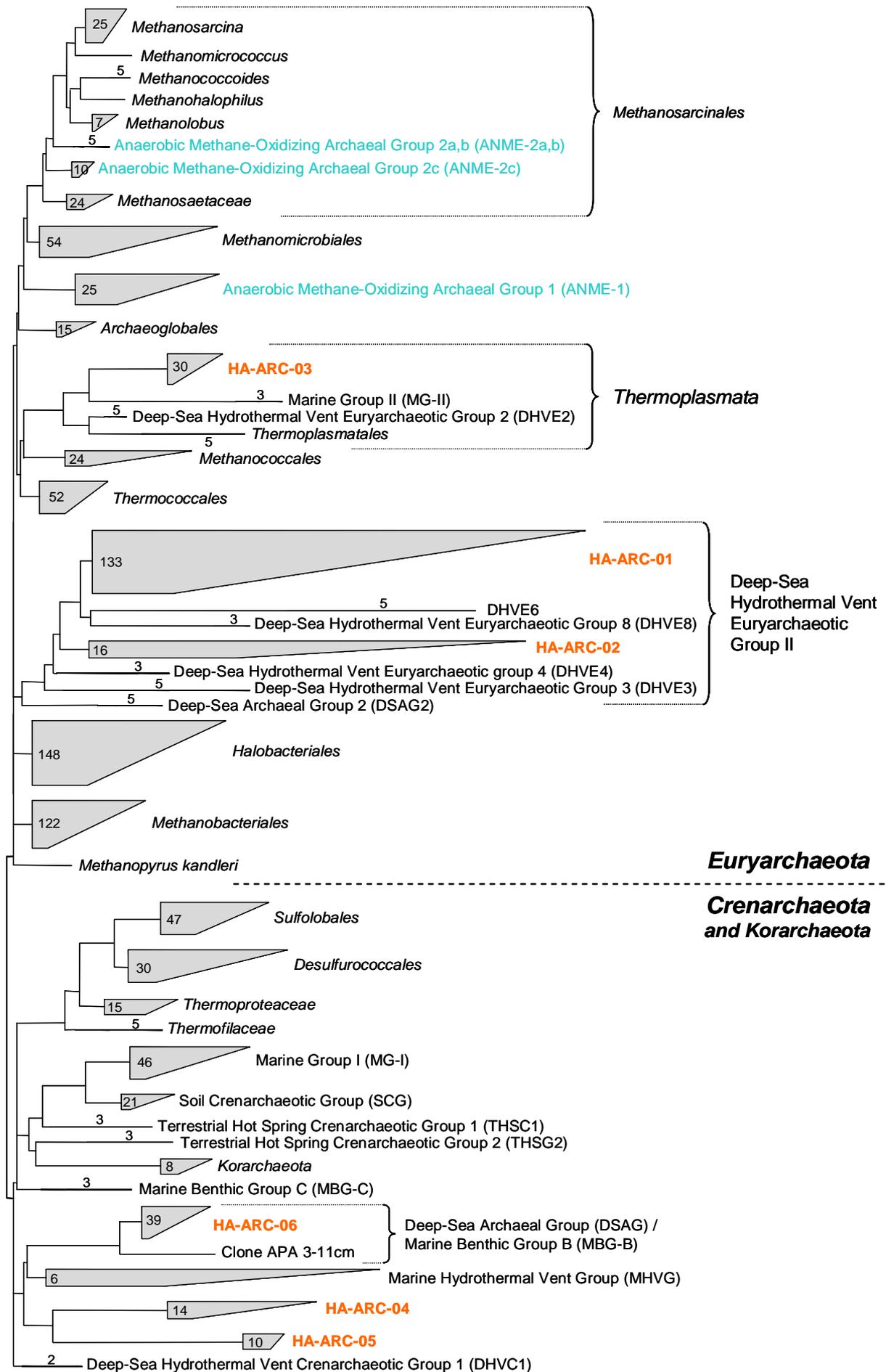
So enthielt der Euryarchaeota-Cluster HA-ARC-03 bei 16 Klonsequenzen nur 2 Phylotypen, wobei Phylotyp 3.1 (Abb. 21b, S. 78) mehr als 99% Sequenz-Identität mit der des in marinen Sedimenten gefundenen unkultivierten Archaeons 63A18 (SCHÄFER 2001, unveröffentlicht) sowie mit der des in oberen Sedimentschichten entdeckten Archaea-Klons OHKA1.30 (INAGAKI 2003, unveröffentlicht) hatte. Phylotyp 3.2 seinerseits wies eine mehr als 99%ige Sequenz-Identität mit dem aus dem anoxischen Sediment eines meromiktischen antarktischen Sees stammenden unkultivierten Archaeon Burton20A auf (BOWMAN et al. 2000). Die gleiche Sequenz-Identität bestand zu dem unkultivierten Archaeon TA1F2, welches HINRICHS et al. (1999) in mit anaerober Methanoxidation assoziierten marinen Sedimenten gefunden hatten. Hierbei handelte es sich jedoch nicht um ein zu den potentiellen anaeroben Methanoxidierern gehörendes Individuum (ANME-1 oder 2). Von den 34 zum Crenarchaeota-Cluster HA-ARC-06 gehörenden Klonen entsprachen allein 29 dem Phylotyp 6.1 und hatten eine mehr als 99%ige Sequenzidentität mit den aus Tiefsee-Sedimenten stammenden Klonen CRA4-23cm und CRA8-23cm (VETRIANI et al. 1999).

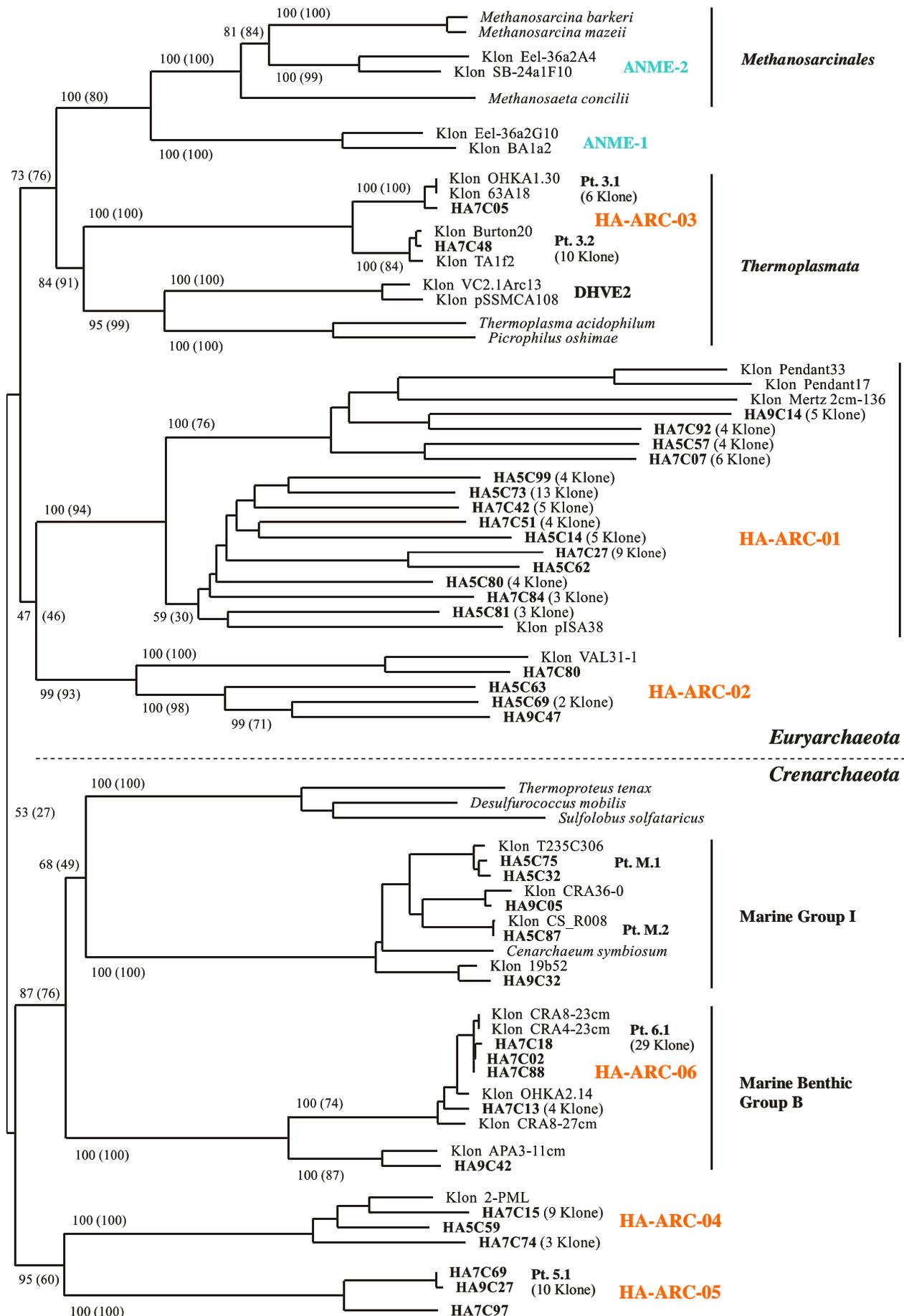
Betrachtete man unter quantitativen Gesichtspunkten wieder die reinen Klonzahlen, so waren die Anteile der aus den verschiedenen Sedimenthorizonten stammenden Klone in den einzelnen Clustern unterschiedlich (s. Tab. 6, S. 75 und Abb. 22, S. 79):

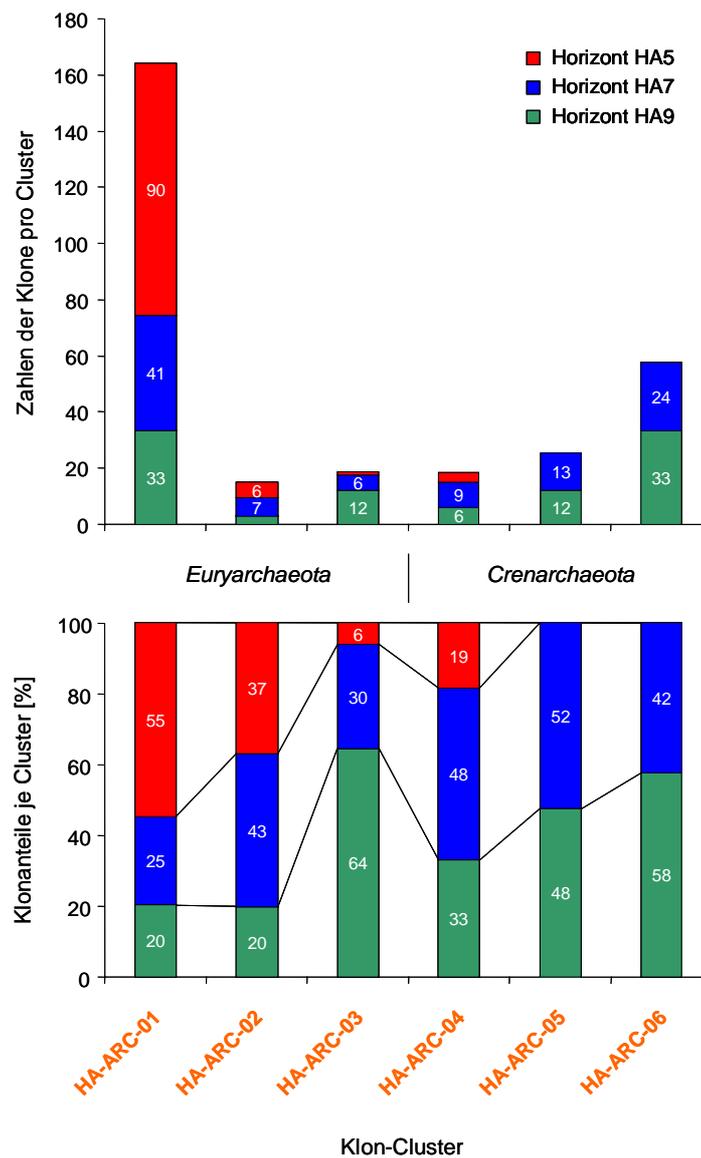
Die Klon-Cluster HA-ARC-02, 04 und 05 beinhalteten Sequenzen aus allen drei Sedimenthorizonten, während sich die Cluster HA-ARC-03 und 06 ausschließlich aus Klonen des weniger (HA9) bzw. kaum aktiven Sedimenthorizontes (HA7) zusammensetzten. Die Mehrheit der Klon-Sequenzen (und Phylotypen) fiel jedoch in den großen, in sich heterogenen Euryarchaeota-Cluster HA-ARC-01, der von Klonen aus dem hochaktiven Horizont HA5 dominiert wurde. Bei den ebenfalls in diesen Cluster fallenden Referenzen handelt es sich ausnahmslos um Sequenzen unkultivierter Organismen, über deren physiologische Charakteristika leider keine Angaben vorliegen. Sie stammen jedoch ebenfalls aus Standorten mit entweder anoxischen Bedingungen (BOWMAN et al. 2000, EDER et al. 1999) oder hydrothermalem Einfluß (TAKAI AND HORIKOSHI 1999).

**Abbildung 21a** auf Seite 77. Phylogenetische Einordnung der Archaea - Klone aus dem Sediment an der Station 32-MUC auf der Basis ihrer 16S rDNA - Sequenzen.

Die Längen der in die Berechnungen eingegangenen Klonsequenzen liegen zwischen 450 und 650 Basen. Die graphische Darstellung beruht auf der Analyse des Alignments mit Hilfe des Parsimony-Algorithmus. Der Maßstab gibt die Zahl der Substitutionen pro Sequenz-Position als phylogenetische Distanz wieder.







**Abbildung 22.** Anteile der aus den Sedimenthorizonten HA5, HA7 und HA9 stammenden Archaea-Klone an den verschiedenen Klon-Clustern. Die Gesamtzahl der Klone aus jedem Horizont wurde auf 100 normiert.

**Abbildung 21b** auf Seite 78. Phylogenetische Einordnung repräsentativer Archaea-Klone (Sediment, Station 32-MUC) auf der Basis ihrer 16S rDNA - Sequenzen. Die durchschnittliche Länge der in die Berechnungen eingegangenen Sequenzen beträgt 460 Basen. Die graphische Darstellung beruht auf der Analyse des Alignments mit Hilfe des Neighbor Joining - Algorithmus, wobei die Baum-Topologie durch Maximum Likelihood - Berechnungen verifiziert wurde. Der Maßstab gibt die Zahl der Substitutionen pro Sequenz-Position als phylogenetische Distanz wieder. Die Konfidenz der Baumstruktur ist durch Bootstrap-Werte (in Prozent) angegeben. Diese basieren auf 1000 Bootstrap-Wiederholungen. Die Maximum Likelihood - Werte stehen in Klammern dahinter und beruhen ihrerseits auf 100 Bootstrap-Wiederholungen.



## *Diskussion*

### **11 Mikrobiologische und geochemische Untersuchungen in Hydrothermalfeldern des Nord-Fiji-Beckens**

#### *11.1 Bakterielle Aktivität in hydrothermal beeinflussten Bereichen der Wassersäule*

##### *11.1.1 Hydrothermal Plumes*

Das Tiefenprofil der im Nord-Fiji-Becken beprobten Wassersäule zeigt im wesentlichen einen für diese Breiten typischen Verlauf physikalischer, chemischer und mikrobieller Parameter: Es existiert eine mehr als 200 m mächtige durchmischte Deckschicht, in der einhergehend mit der Primärproduktion photoautotropher Organismen auch die höchste heterotrophe Bakterienaktivität gemessen wurde. Unterhalb der permanenten Sprungschicht, die das warme Oberflächenwasser physikalisch vom kalten Tiefenwasser trennt, ist die bakterielle Aktivität aufgrund des geringen Eintrags organischer Verbindungen um ein Vielfaches niedriger.

Die an den Stationen MS43 und 55 im unteren Bereich der Wassersäule auftretenden Werte-Anomalien in den physikalischen, chemischen und mikrobiologischen Parametern sind deutliche Zeichen für einen hydrothermalen Einfluß in diesem Tiefenbereich. Die Hydrothermal Plumes grenzen sich eindeutig durch erhöhte Werte für Wassertemperatur und Methan sowie erniedrigte Werte für Salinität und Sauerstoff gegenüber dem sie umgebenden Tiefenwasser ab. Die mit den hydrothermalen Fluiden aus dem Quellbereich eingetragenen organischen und reduzierten anorganischen Verbindungen bilden hier wahrscheinlich die Grundlage für eine deutlich erhöhte bakterielle Produktion. Daß im Inkubationsexperiment mit einer Plume-Probe (Station MS43) bei Oberflächentemperatur die maximale Sekundärproduktion der Deckschicht übertroffen wird, unterstreicht hierbei das große Aktivitäts-Potential der offensichtlich überwiegend heterotrophen mesophilen Plume-Gemeinschaft.

### ***11.1.2 Hydrothermale Gradienten***

In unmittelbarer Nähe der Hydrothermalquellen vermischen sich die diffus austretenden Fluide mit dem kalten Tiefenwasser. Gibt es keine stärkeren strömungsbedingten Turbulenzen, erfolgt diese Vermischung kontinuierlich, so daß sich in Bodennähe ein hydrothermaler Gradient aufbaut, in welchem der Fluidanteil mit Abstand zur Quelle abnimmt. Dementsprechend nehmen die Konzentrationen der über die Fluide eingetragenen Komponenten (Sulfid und Methan) ebenfalls mit zunehmender Entfernung zum Meeresboden ab.

Gleiche Profile zeigen die mikrobiellen Parameter. Ein direkter Zusammenhang findet sich hierbei zwischen der Sulfidkonzentration und den Zellzahlen der dieses Substrat nutzenden auto- und heterotrophen Schwefeloxidierer. Die in Richtung zum Fluidaustritt zunehmenden Gesamtbakterienzahlen und die ebenfalls ansteigende Sekundärproduktion lassen sich jedoch nur zu einem geringen Teil auf eine direkte Verwertung der von chemolithotrophen Prokaryoten bereitgestellten Verbindungen zurückführen. Da der basaltische Untergrund am Ort der Probenahme dicht mit Makrofauna besiedelt war, ist der Einfluß des hier freigesetzten organischen Materials auf die heterotrophe bakterielle Produktion erheblich, zumal sich die Beprobung des hydrothermalen Gradienten über die ersten 30 cm in Bodennähe erstreckte.

## ***11.2 Bakterielle Diversität in hydrothermal beeinflussten Wasserkörpern***

### ***11.2.1 Unterschiede zum umgebenden Tiefenwasser***

Die deutlichen Unterschiede in Volumen und Morphologie der prokaryotischen Zellen, die aus Hydrothermal Plumes stammten, gegenüber denen, die im umgebenden Tiefenwasser gefunden wurden, sind bereits ein erster Hinweis auf anders zusammengesetzte Bakteriengemeinschaften. Auch sind die im Zuge der elektronenoptischen Untersuchungen erfaßten, häufig in Quellnähe vorkommenden, Bakterien in Form und Größe mit denen an anderen Hydrothermalstandorten vergleichbar (JANNASCH AND WIRSEN 1979, JANNASCH AND WIRSEN 1981, HARWOOD et al. 1982). Hierbei ist jedoch anzumerken, daß der physiologische Zustand einer Bakterienzelle großen Einfluß auf ihre Form und Größe hat und unter Umständen vage gruppenspezifische Merkmale überdeckt.

Die mit Hilfe der DGGE erstellten Diversitätsmuster zeigen jedoch ebenfalls deutliche Unterschiede zwischen Bakteriengemeinschaften in unter hydrothermale

Einfluß stehenden Wasserkörpern und Gemeinschaften in unbeeinflussten Bereichen. Hierbei scheint die bakterielle Diversität in Proben mit Fluid-Anteilen generell höher zu sein.

Die starke Ähnlichkeit einer Bandensequenz von der Station MS55 zu der des thiotrophen Symbionten der Muschel *Bathymodiolus thermophilus* weist zudem auf einen ebenfalls von Vent-Fauna besiedelten Fluidaustritt als Quelle für die dort lokalisierte Plume hin.

Die hohen Similaritäten von Sequenzen, die aus Proben von den quellnahen HBS-Stationen (und aus der Anomalie an der Station MS43) hervorgegangen sind, zu denen Vent - typischer Bakterien (s. Kap 11.2.2) können neben physikalischen und chemischen Eigenheiten ebenfalls als Indikatoren für einen hydrothermalen Einfluß gewertet werden.

### **11.2.2 Unterschiede zwischen verschiedenen hydrothermal beeinflussten Wasserkörpern**

Die DGGE-Bandenmuster der direkt in Quellnähe genommenen HBS-Proben unterscheiden sich kaum von dem der Hydrothermal Plume, die an der benachbarten Station MS43 beprobt wurde. Deutliche Unterschiede hingegen sind zum Diversitätsmuster der an der entfernter gelegenen Station MS55 untersuchten Anomalie erkennbar.

Der auf Klonierungsexperimenten beruhende Diversitäts-Vergleich der Plume an der Station MS55 mit dem direkt an der Quelle beprobten hydrothermalen Mischwasser von der Station HBS90 zeigt ebenfalls deutliche Unterschiede in der Diversität der beiden Bakteriengemeinschaften und bestätigt damit die Ergebnisse der vorangegangenen DGGE-Analysen. Insbesondere die chemolithotrophen Schwefeloxidierer, die die in Quellnähe noch hohen Sulfidkonzentrationen nutzten und an der Station HBS90 immerhin 9% aller Klone ausmachten, sind in der Anomalie an der Station MS55 nicht mehr nachweisbar. Statt dessen wird die Plume-Gemeinschaft dort stark von chemoorganotrophen Vertretern der Gattung *Bradyrhizobium* dominiert.

Ein Großteil dieser Klone wurde als *Bradyrhizobium elkanii* identifiziert (99,7 - 100% Sequenzidentität; s. Anhang Kap. 19.1, Tab. A1, S. 121), einem Alphaproteobakterium, das bisher eher dafür bekannt war, in Symbiose mit Sojapflanzen molekularen Stickstoff zu fixieren (RUMJANEK et al. 1993, CHEN et al. 2000). Unter mikroaerophilen Bedingungen sind diese Rhizobien jedoch in der Lage, auch allein molekularen Stickstoff zu binden (MADIGAN et al. 2001). Das partikuläre organische Material, das in hohen Konzentrationen aus dem Quellbereich der Plume mit eingetragen wird, könnte solche an- bzw. mikrooxygenen Nischen zur Verfügung stellen.

COMITA und GAGOSIAN (1984) haben ebenfalls Untersuchungen in unterschiedlich stark hydrothermal beeinflussten Wasserkörpern am East Pacific Rise durchgeführt. Hierbei stießen sie auf das Phänomen, daß sich der Stickstoffanteil des im hydrothermalen Mischwasser befindlichen partikulären organischen Materials mit geringer werdendem Fluidanteil ebenfalls deutlich verringerte. Insofern hätten die zur Stickstoff-Fixierung befähigten Bradyrhizobien unter ähnlichen N-limitierten Bedingungen in der Plume an der Station MS55 einen Selektionsvorteil gegenüber anderen an Partikel gebundenen Bakterien. Eine alternative Erklärung für die auffällige Dominanz dieser Art wäre eine methodisch bedingte Überschätzung ihrer Präsenz (s. Kap. 15.2, S. 98).

Der hier im Klonierungsexperiment ermittelte Anteil von thiotrophen Bakterien (9%) an der quellnahen Gemeinschaft (Station HBS90) stimmt gut mit den Ergebnissen von UTSUMI et al. (1994) überein, die auf der Grundlage von Kultivierungsversuchen mit Selektivmedien den Anteil von Thiosulfat-Nutzern in den von ihnen im Nord-Fiji-Becken beprobten Fluiden auf maximal 8% schätzten. Die im Rahmen der phylogenetischen Analysen an der Station HBS90 identifizierten Schwefeloxidierer standen den Gattungen *Thiothrix* und *Thiomicrospira* nahe. Diese gehören zu den am häufigsten an Hot Vent - Standorten vorkommenden Mikroorganismen überhaupt (JANNASCH AND TAYLOR 1984).

Außerdem finden sich in der quellnahen Gemeinschaft Vertreter weiterer für Hydrothermalstandorte typischer Gruppen:

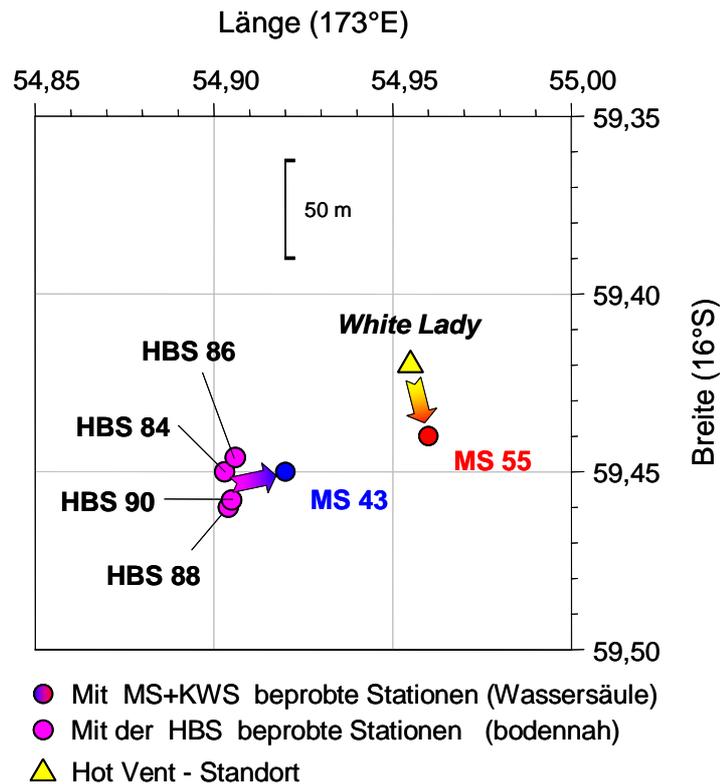
Sulfatreduzierer aus der Gruppe der Deltaproteobakterien sowie signifikante Zahlen von Epsilonproteobakterien, denen verschiedene Autoren aufgrund ihrer Dominanz in Hot Vent - Bakteriengemeinschaften allgemein eine wichtige Rolle bei den in hydrothermalen Tiefsee-Lebensräumen ablaufenden biogeochemischen Prozessen zuweisen (REYSENBACH et al. 2000, LONGNECKER AND REYSENBACH 2001, CORRE et al. 2001).

Ferner Mitglieder der OP8 candidate division, die zuerst an terrestrischen (HUGENHOLTZ et al. 1998), später auch an marinen Hydrothermalstandorten gefunden wurden (TESKE et al. 2002).

Alle diese Bakteriengruppen sind in der an der Station MS55 beprobten Hydrothermal Plume (und im umgebenden Tiefenwasser) nicht vertreten.

Die in beiden molekularbiologischen Ansätzen zur Diversitätsanalyse (DGGE und Klonierungsexperiment) sichtbaren gravierenden Unterschiede in der bakteriellen Diversität haben vermutlich zwei Ursachen:

- 1.) Die höhere Einschichtung in der Wassersäule und ihre chemische Zusammensetzung charakterisieren die Plume an der Station MS55, anders als die an der Station MS43, als Emanation eines Hoch-Temperatur-Fluidaustritts (KOSCHINSKY et al. 2002). Ihre Quelle ist wahrscheinlich der in der Nähe gelegene Hot Vent „White Lady“ (Abb. 23).



**Abbildung 23.** Stationskarte Areal A (Nord-Fiji-Becken):  
Wahrscheinliche Quellen der an den Stationen MS43 und MS55 beprobten Plumes.

HUBER et al. (2002) haben für einen Hydrothermal-Standort am Juan de Fuca Ridge gezeigt, daß die Zusammensetzung der dort ansässigen Archaea-Gemeinschaft in Abhängigkeit von der sich über 3 Jahre verändernden hydrothermalen Aktivität stark fluktuierte. Man kann also davon ausgehen, daß die spezifischen Fluid-Eigenschaften der im Nord-Fiji-Becken untersuchten Quellen ebenfalls einen maßgeblichen Einfluß auf die Struktur der Bakteriengemeinschaften in den unter hydrothermale Einfluß stehenden Wasserkörpern haben. So unterscheiden sich die Diversitätsmuster innerhalb des aus warmen Quellen bestehenden Hydrothermalfeldes (HBS90, HBS88 und HBS84) kaum von dem der hier gebildeten Hydrothermal Plume (MS43, Abb. 23), jedoch deutlich von dem der „White Lady - Plume“ (MS55).

2.) Die Signale der einen hydrothermalen Einfluß kennzeichnenden Parameter in der „White Lady - Anomalie“ sind wesentlich schwächer, als die in der aus den warmen Quellen gespeisten Plume. Da aber in der Hoch-Temperatur-Emanation der Fluidanteil eigentlich höher und die Signale entsprechend stärker sein sollten, ist dies ein Hinweis darauf, daß es sich bei dem an der Station MS55 beprobten Anomalie-Bereich wahrscheinlich um den äußeren, älteren Teil einer Plume handelt. In dieser stärker mit Meerwasser durchmischten Zone haben nicht zuletzt auch mikrobiologische Alterationsprozesse zu gravierenden chemischen Veränderungen

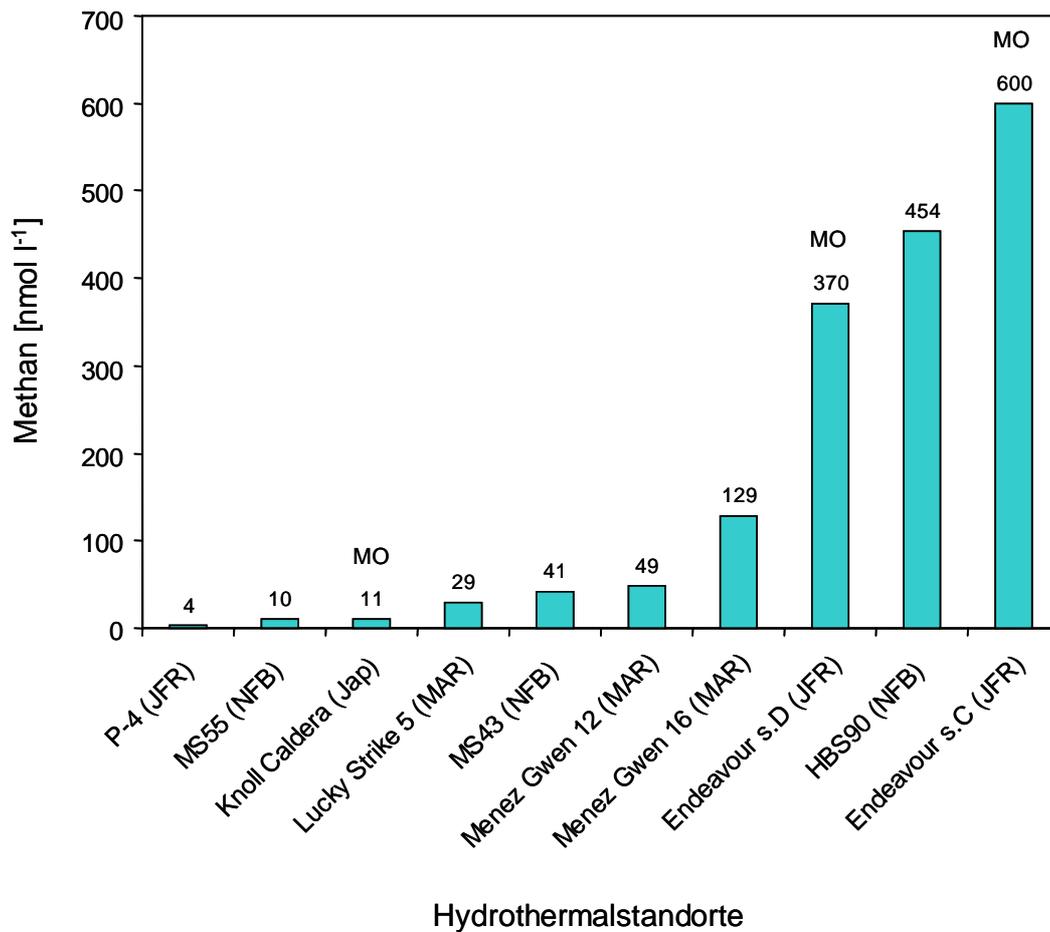
und einer Verarmung an reduzierten Verbindungen geführt. Demzufolge sind hier thiotrophe und andere Vertreter Vent-typischer Gruppen stark in den Hintergrund getreten. Statt dessen dominieren chemoorganotrophe Bakterien diese eher pelagisch geprägte „Plume-Gemeinschaft“, deren Entwicklung durch den Eintrag von organischem Material aus dem Quellbereich begünstigt wird.

### 11.2.3 Vergleich mit anderen Hydrothermalstandorten

Vergleicht man die von uns im Nord-Fiji-Becken beprobten hydrothermal beeinflussten Wasserkörper mit denen anderer Hydrothermalstandorte, so liegen die maximalen Methankonzentrationen in den Hydrothermal Plumes im unteren Bereich der bisher in solchen Anomalien gemessenen Werte (Abb. 24). Die hier unmittelbar an den warmen Fluidaustritten bestimmten Methankonzentrationen (maximal 617 nmol l<sup>-1</sup>, HBS88) sind auch um ein vielfaches geringer als die an den Hot Vents des Mittelatlantischen Rückens (0,05 - 2,6 mmol l<sup>-1</sup>) oder East Pacific Rise (0,03-0,09 mmol l<sup>-1</sup>), die eher im mikro- bis millimolaren Bereich liegen (KARL 1995, DESBRUYÈRES et al. 2000, COWEN et al. 2002). Es konnte jedoch auch an anderen Standorten mit vergleichbar niedrigen Konzentrationen biologische Methanoxidation nachgewiesen werden (DE ANGELIS et al. 1993, TSUNOGAI et al. 2000, COWEN et al. 2002). So ist es zunächst verwunderlich, daß in keiner der von uns im Nord-Fiji-Becken untersuchten Proben ein mikrobieller Methanumsatz gemessen werden konnte (Bei den gegebenen Bedingungen läge die minimal nachweisbare Methanoxidationsrate bei ca. 0,01 nmol l<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>).

DE ANGELIS et al. (1991) stießen bei ihren Untersuchungen am Juan de Fuca Ridge auf das Phänomen, daß die maximale Methanoxidation nicht zusammen mit den höchsten Methankonzentrationen in unmittelbarer Nähe des Fluidaustrittes, sondern in einem 2-5 km entfernten Bereich der resultierenden Plume auftrat. Sie folgerten hieraus, daß die für den Oxidationsprozeß verantwortlichen Bakterienpopulationen aus dem umgebenden Tiefenwasser in die Plume eingetragen werden und erst nach einiger Zeit, in Folge des durch die großen Methanmengen stimulierten Wachstums, ihre maximale Kapazität erreichen. Dies wäre zumindest eine mögliche Erklärung für die fehlende methanotrophe Aktivität in Quellnähe (HBS-Stationen).

Die Messungen der Oxidationsraten, die aufgrund der niedrigen Methankonzentrationen in allen Proben ebenfalls als gering einzuschätzen wären, könnten noch zusätzlich durch die Inkubation unter Normaldruck negativ beeinflusst worden sein. So haben DE ANGELIS et al. (1991) festgestellt, daß unter diesen Bedingungen ein Aktivitätsabfall von ca. 20% gegenüber der Inkubation bei *in situ* - Druck erfolgt. Ferner ist es denkbar, daß ein erheblicher Teil des von den methanotrophen Bakterien aufgenommenen Methans in Form von Intermediaten (z.B. Formaldehyd) gebunden und ausgeschieden wurde, die durch das eingesetzte Meßverfahren nicht erfaßt werden.



**Abbildung 24.** Maximale Methankonzentrationen an den im Nord-Fiji-Becken untersuchten Stationen (Hydrothermal Plumes (MS) und Fluidaustritte (HBS)) im Vergleich zu denen in Plumes an anderen marinen Hydrothermalstandorten (Referenzwerte nach WINN AND KARL 1986, DE ANGELIS et al. 1993, RADFORD-KNOERY et al. 1998, TSUNOGAI et al. 2000, COWEN et al. 2002).

MO = Standorte an denen bei gegebener Methankonzentration auch biologische Methanoxidation nachgewiesen werden konnte

JFR = Juan de Fuca Ridge

NFB = Nord-Fiji-Becken

Jap = Japan

MAR = Mid Atlantic Ridge.

Die mit entsprechenden Parallelen angesetzten Anreicherungen für methanotrophe Bakterien sowie die molekularbiologischen Diversitätsuntersuchungen zeigen jedoch, daß letztlich keine meßtechnischen Probleme dafür verantwortlich waren, daß keine bakterielle Methanoxidation gemessen werden konnte. Denn sowohl das ausbleibende Wachstum in den Anreicherungen, als auch der fehlende Nachweis

von Vertretern bekannter methanotropher Gattungen in den Klonierungsexperimenten deuten darauf hin, daß aerobe methanoxidierende Bakterien an den untersuchten Standorten keine signifikante Rolle spielten. Offenbar sind die hier vorhandenen Methankonzentrationen für die Etablierung einer Methanotrophen-Population doch zu niedrig.

Diese Erkenntnis wird zusätzlich durch die Untersuchungsergebnisse der am Projekt beteiligten zoologischen Arbeitsgruppe bestätigt, nach denen die dominierenden Muschel- und Schneckenarten ausschließlich in Symbiose mit thiotrophen und nicht mit methanotrophen Bakterien leben (BOROWSKI und GIERE 2001).

Somit sind es die Prozesse des Schwefelkreislaufs und die an diesen Umsetzungen beteiligten Mikroorganismen, die im wesentlichen die Basis für das üppige Leben an den im Nord-Fiji-Becken untersuchten warmen Quellen bilden.

Den Hauptteil der produktiven bakteriellen Biomasse stellen hierbei, wie generell an entsprechend besiedelten Hydrothermalstandorten (JANNASCH AND TAYLOR 1984, JANNASCH UND MOTTL 1985), die mit der ansässigen Vent-Fauna vergesellschafteten chemolithotrophen Symbionten. Selbst in einem kleinen Exemplar der Muschel *Bathymodiolus brevior* (5 cm Schalenlänge) befinden sich 1000-mal mehr thioautotrophe Symbionten als prokaryotische Zellen in einem Liter des hydrothermal beeinflussten Wassers in unmittelbarer Quellnähe (vergl. Kap. 8.4, S. 64 und Abb. 11, S. 55).

Die von der Fauna freigesetzten Mengen an organischem Material werden an den Fluidaustritten zusammen mit den reduzierten Fluidbestandteilen als Plumes in die untere Wassersäule eingetragen. In diesen mit zunehmender Entfernung von der Quelle an reduzierten (Schwefel-) Verbindungen verarmenden Wasserkörpern wird die Vent-typische Bakteriengemeinschaft (mit signifikanten Anteilen an chemolithotrophen Vertretern) dann durch eine chemoorganotrophe, pelagisch geprägte Gemeinschaft abgelöst.

## 12 Mikrobiologische und geochemische Untersuchungen in Cold Seeps des Makran-Akkretionskeils vor der Küste Pakistans

### 12.1 Hinweise auf eine bisher unbekannte Gattung von methanotrophen Bakterien

Bei den aus dem Oberflächensediment verschiedener Cold Seep - Standorte im Bereich der Makran-Akkretion gewonnenen Isolaten handelt es sich ausnahmslos um zur Familie der Methylococcaceae gehörende Gammaproteobakterien. Obwohl die geographische Distanz zwischen den beprobten Stationen relativ groß war und verschiedene Anreicherungsmedien verwendet wurden, lassen sich die 10 isolierten methanotrophen Bakterien letztlich auf nur 2 verschiedene Phäno- bzw. Genotypen zurückführen.

Die Makran Typ 2 - Isolate wurden hierbei auf genetischer Basis eindeutig als *Methylobacter* sp. Strain BB5.1 identifiziert. Bei diesem von SMITH et al. (1997) aus dem Oberflächensediment des Newport Bay Ästuars (Kalifornien) isolierten Bakterium handelt es sich um einen methanotrophen Organismus, der in mit Kupfer angereichertem Medium neben Methan auch Trichlorethylen oxidiert.

Die Übereinstimmungen der 16S rDNA Vollsequenzen der Vertreter des Makran Typ 1 mit denen der nächsten Verwandten hingegen liegen mit maximal 94% deutlich unter dem Wert, der für eine ordentliche Zuordnung auf Gattungs- oder Artebene gefordert wird (FOX et al. 1992, HUGHES et al. 2001, HAGSTRÖM et al. 2002). Selbiges gilt auch für den entsprechenden Vergleich mit Referenzsequenzen von für die partikuläre Methan-Monooxygenase codierenden Genabschnitten (*pmoA*, maximal 86%). Während auf 16S rDNA-Ebene in allen Fällen wieder die Sequenz von *Methylobacter* sp. Strain BB5.1 als die nächstähnliche angegeben wird, zeigen die *pmoA*-Sequenzen der Makran Typ 1 - Isolate Similaritäten zu homologen Sequenzen von Spezies anderer Gattungen. Hierbei ist die Identität der *pmoA*-Sequenzen der Isolate Mi 2B und 9B mit der von *Methylomonas* sp. LW15 am größten. Dieser von COSTELLO und LIDSTROM (1999) klassifizierte Klon stammt aus Populationen Methan-oxidierender Bakterien im Sediment des Lake Washington (Washington).

In der graphischen Darstellung der Ergebnisse der phylogenetischen Analysen (s. Abb. 17, S. 69 und Abb. 18, S. 70) bilden die zum Makran Typ 1 gehörenden Isolate eine eigenständige, auf *pmoA*-Ebene der Gattung *Methylomonas* nahestehende Gruppe. Obwohl die Kolonien des Makran Typs 1 wie auch die von *Methylomonas*

eine deutliche rosa Färbung aufweisen, werden jedoch (anders als bei *Methylomonas*) keine Ruhestadien ausgebildet. Weiterhin zeigt der Makran Typ 1 in seinem Fettsäuremuster Ähnlichkeiten zur Gattung *Methylobacter*, was ebenfalls einer Zugehörigkeit zur Gattung *Methylomonas* widerspricht.

Aufgrund der ausgeprägten phäno- und genotypischen Eigenheiten des Makran Typs 1 ist davon auszugehen, daß es sich hierbei um eine bisher undokumentierte Gattung methanotropher Bakterien handelt.

Der interne Vergleich der 16S rDNA- und *pmoA*-Sequenzen der Makran Typ 1 - Isolate legt außerdem nahe, die zu dieser Gattung gehörenden Isolate zwei verschiedenen Arten zuzuordnen. Hierbei können die auf 16S rDNA-Ebene weitestgehend identischen Isolate Mi 2A, 2B und 9B als taxonomische Einheit gegenüber dem Isolat Mi 9A (98% Sequenzidentität) abgegrenzt werden.

Eine Stützung dieser in erster Linie auf genetischen Informationen beruhenden Differenzierung durch physiologische Tests ist leider nicht möglich, da die Isolate nicht vollständig in Reinkultur vorliegen.

Aerobe Methan-oxidierende Bakterien wurden bei bisherigen molekulargenetischen Diversitätsuntersuchungen an anderen Cold Seep - Standorten meist nicht aufgefunden (LI et al. 1999, INAGAKI et al. 2002). Dies hängt damit zusammen, daß in den untersuchten Sedimenten überwiegend bis an die Sedimentoberfläche anoxische Verhältnisse herrschten (Schwefelwasserstoff-Geruch bzw. signifikante Sulfidkonzentrationen). Demzufolge lag der Schwerpunkt der Untersuchungen an den ebenfalls von Gas-Hydraten gespeisten Seeps vor der Küste Oregons auch auf den an der anaeroben Methanoxidation beteiligten Prokaryoten (HINRICHS et al. 1999, BOETIUS et al. 2000). Nur Li et al. (1999a) fanden einen entfernt mit *Methylobacter* sp. JTB256 verwandten Klon im Sediment eines mit *Calyptogena* besiedelten Cold Seep - Areal im Japan Trench (6400m Tiefe). Die Sequenzidentitäten dieses Klons mit den Makran-Isolaten liegen jedoch unter 90%.

Die nachgewiesene Existenz aerober methanoxidierender Bakterien an Cold Seeps im Bereich der Makran-Akkretion beruht vermutlich auf der Tatsache, daß die untersuchten Proben aus den Randbereichen der Gas-Seeps stammten, in denen das Sediment nicht bis an die Oberfläche anoxisch war. Hier ist der Fluidfluß nicht so stark wie in den zentralen Bereichen, so daß Sauerstoff aus dem Tiefenwasser in die obersten Sedimentschichten eindringen kann.

### **13 Diversität und Aktivität von Prokaryoten-Gemeinschaften in den Sedimenten der Bransfield Straße (Antarktis)**

#### *13.1 Mikrobielle Aktivitäten in hydrothermal beeinflussten, anoxischen Sedimenten*

Sowohl die gegenüber dem Umgebungswasser erhöhte Temperatur als auch die niedrigen pH-Werte sind deutliche Zeichen für einen hydrothermalen Einfluß auf das am Hook Ridge beprobte Sediment. Das bis zur Sedimentoberfläche nachweisbare Sulfid zeigt außerdem, daß hier alle mikrobiellen Stoffumsätze unter anaeroben Bedingungen ablaufen. Bis in 5 cm Tiefe läßt sich neben Sulfid auch noch Nitrat nachweisen (s. Abb 19a und c, S. 73). Somit ist in diesem Bereich die anaerobe Schwefeloxidation unter Verwendung von Nitrat als Elektronenakzeptor ein wahrscheinlicher, für die hier gemessene CO<sub>2</sub>-Fixierung verantwortlicher Prozeß. Dieser Stoffwechselweg ist z.B. für einige *Thiobacillus*-Arten nachgewiesen (MADIGAN et al. 2001).

Die unterhalb von 13,5 cm Sedimenttiefe gegenläufigen Profile von Sulfat und Sulfid (s. Abb 19a und b, S. 73), in denen abnehmende Sulfat- ansteigenden Sulfidkonzentrationen gegenüberstehen, können als Hinweis auf die Aktivität Sulfat-reduzierender Bakterien gewertet werden. Außerdem deuten die in allen untersuchten Horizonten gefundenen, kultivierten Sulfatreduzierern nahestehenden Klone darauf hin, daß die bakterielle Sulfatreduktion in weiten Bereichen des Sedimentes von Bedeutung ist (s. Kap. 13.2.2, S. 95).

Das zur Sedimentoberfläche hin in geringer werdenden Konzentrationen vorkommende Methan muß ebenfalls bei anoxischen Verhältnissen umgesetzt werden. Der nachgewiesene Methanumsatz kann daher nicht auf die Aktivität aerober methanotropher Bakterien zurückgeführt werden. Verantwortlich für die anaerobe Methanoxidation ist hier vermutlich eine syntrophe Gemeinschaft von Sulfat-reduzierenden Bakterien und bisher unbekanntem methanogenen Archaea (s. Kap 13.2.1, S. 94). Die anaerobe Oxidation von Methan durch Konsortien bestehend aus Sulfatreduzierern und speziellen Gruppen methanogener Archaea wurde bereits von anderen Autoren nachgewiesen (HOEHLER et al. 1994, HINRICHS et al. 1999, THIEL et al. 1999, BOETIUS et al. 2000, ELVERT et al. 2000; siehe auch Kap. 2.3.2, S. 9).

Der kontinuierliche, eher konkave Verlauf der zur Sedimentoberfläche hin abnehmenden Methankonzentrationen (s. Abb 19d, S. 73) ist neben den gemessenen Methanoxidationsraten ein weiterer Beweis für den anaeroben Umsatz von Methan

in den oberen Sedimentschichten. Ein rein durch Diffusion bzw. Fluidfluß bedingtes Methanprofil würde dagegen einen konvexen Verlauf aufweisen.

Das Sulfatprofil hingegen läßt sich nicht durch die Aktivität an der anaeroben Methanoxidation beteiligter Sulfatreduzierer erklären, zumal die Sulfatkonzentrationen gerade in den Horizonten mit dem höchsten Methanumsatz konstant bleiben. Hierbei ist allerdings zu beachten, daß die Sulfatwerte um drei Zehnerpotenzen höher liegen als die für Methan (s. Abb 19b und d, S. 73), so daß der Umsatz äquimolarer Mengen von Sulfat und Methan im Rahmen des anaeroben Oxidationsprozesses (NAUHAUS et al. 2002) hier kaum zu meßbaren Änderungen in den Sulfatkonzentrationen führen würde.

In Bezug auf den Methanhaushalt in den anoxischen Sedimenten am Hook Ridge ist der Prozeß der anaeroben Methanoxidation von hoher Relevanz. So wird bei maximalen Oxidationsraten von  $0,9 \mu\text{mol dm}^{-3} \text{d}^{-1}$  die im selben Sedimenthorizont vorhandene Methanmenge ( $0,7 \mu\text{mol l}^{-1}$ ) innerhalb eines Tages vollständig umgesetzt (s. Abb 19d und f, S. 73). Aus dem Profil der zur Oberfläche hin minimal werdenden Methankonzentrationen (s. Abb 19f, S. 73) wird ersichtlich, daß das durch den Fluidstrom nachgeführte Methan hier bereits innerhalb des Sedimentes fast vollständig oxidiert wird.

Betrachtet man jedoch die Methanoxidationsraten im Vergleich zu den Raten der etwa um den Faktor 30 höheren  $\text{CO}_2$ -Fixierung, so wird deutlich, daß andere mikrobielle Prozesse (z.B. anaerobe Schwefeloxidation s.o.) die insgesamt im Sediment ablaufenden Stoffumsätze dominieren.

Der hier untersuchte Standort ist am ehesten mit den ebenfalls hydrothermal beeinflussten Sedimenten im Guaymas Becken (Golf von Kalifornien) zu vergleichen. Hier fanden Teske et al. (2002) in anoxischen Bereichen ebenfalls Hinweise auf einen anaeroben Methanumsatz durch eine syntrophe Prokaryoten-Gemeinschaft. Begleitende Ratenmessungen sind bisher noch nicht veröffentlicht. Aufgrund der außerordentlich hohen Methankonzentrationen von 12 bis  $16 \text{ mmol l}^{-1}$  ist jedoch davon auszugehen, daß diese wesentlich über den im Hook Ridge - Sediment gemessenen Werten liegen.

## *13.2 Prokaryotische Diversität im Hinblick auf potentiell an der anaeroben Methanoxidation beteiligte Gruppen*

### *13.2.1 Archaea*

Die Sedimenthorizonte, in denen unterschiedlich hohe Methanoxidationsraten gemessen wurden, beherbergen auch verschiedene Archaea-Gemeinschaften, die sich in ihrer Struktur deutlich voneinander unterscheiden. Hierbei weisen die Horizonte mit geringer und mittlerer Aktivität (HA7 und HA9) jeweils eine relativ hohe Diversität auf. Die Mehrheit der aus dem hochaktiven Horizont HA5 stammenden Klone wird hingegen einem einzigen großen Cluster (HA-ARC-01) zugeordnet. Dieser Klon-Cluster ist in sich sehr heterogen und besteht überwiegend aus bisher unbeschriebenen Euryarchaeota. Dagegen lassen sich viele der in den anderen Clustern vereinigten Klone zu Phylotypen zusammenfassen, deren Verwandte größtenteils auch in anderen marinen Lebensräumen vorkommen.

Trotz des nachgewiesenen anaeroben Umsatzes von Methan konnte bei keinem der gefundenen Klone eine Verwandtschaft mit bisher bekannten Gruppen von potentiellen anaeroben Methanoxidierern (ANME-1 und 2, HINRICHS et al. 1999, TESKE et al. 2002) festgestellt werden. Geht man davon aus, daß methanogene Archaea für die beobachtete Methanoxidation verantwortlich sind, lassen sich die Klone der Crenarchaeota-Cluster (HA-ARC-04, 05 und 06) als am Oxidationsprozeß beteiligte Organismen ausschließen, zumal alle bisher bekannten Gattungen methanogener Archaea den Euryarchaeota angehören (MADIGAN et al. 2001).

Während der Crenarchaeota-Cluster HA-ARC-06 zahlreiche Phylotypen enthält, die auch in Sedimenten anderer nicht hydrothermal beeinflusster mariner Standorte vorkommen (VETRIANI et al. 1999), positionieren sich die Cluster HA-ARC-04 und 05 entfernt von allen bekannten Gruppen. Bei der einzigen Referenz innerhalb des HA-ARC-04 - Clusters handelt es sich um einen aus Salinen an der spanischen Küste stammenden Klon (2-PML, BENLLOCH et al. 2002). Für die im Cluster HA-ARC-05 zusammengefaßten Klone ließen sich hingegen in den zugänglichen Datenbanken bisher keinerlei verwandte Sequenzen finden.

Der Euryarchaeota-Cluster HA-ARC-03 enthält keine Klone aus dem Sedimenthorizont mit dem höchsten Methanumsatz. Ferner spricht die Nähe zu pelagischen Archaea nicht unbedingt dafür, daß es sich bei Vertretern innerhalb dieses Clusters um Methanogene handelt. Bei den in den Euryarchaeota-Cluster HA-ARC-01 fallenden Referenzen hingegen handelt es sich um Klone, die aus Umgebungen stammen, in denen zwar keine Untersuchungen zur anaeroben Methanoxidation durchgeführt wurden, in allen Fällen jedoch Bedingungen gegeben waren, unter

denen eine solche Aktivität möglich bzw. wahrscheinlich ist. So wurde der Klon pISA38 aus dem Sediment eines aktiven Hydrothermalfeldes im Okinawa Graben amplifiziert, dessen Fluide sich durch hohe Konzentrationen an Methan und Schwefelwasserstoff auszeichneten. Dieser Klon wurde von TAKAI und HORIKOSHI (1999) mit von anderen Hydrothermalstandorten stammenden zur „Deep-Sea Hydrothermal Vent Euryarchaeotic Group II“ zusammengefaßt. In dieselbe Großgruppe wurden nun auch die Euryarchaeota-Cluster HA-ARC-01 und 02 eingeordnet. Hierbei ist der HA-ARC-01 - Cluster wiederum ein Subcluster der von BOWMAN et al. (2000) vorgeschlagenen „Sediment Archaea Group“. Zu dieser Gruppe aus anoxischen Sedimenten meromiktischer antarktischer Seen hervorgegangener Klone (Referenzen Pendant-17 und 33) ordneten sich auch Sequenzen anderer unkultivierter Archaea. Diese stammten von unterschiedlichen Standorten, deren einzige Gemeinsamkeit die dort vorherrschenden anoxischen Bedingungen waren. Deshalb wurde für Mitglieder der „Sediment Archaea Group“ ein anaerober Stoffwechsel postuliert. Unter ihnen befand sich der Klon WCHD3-30, welcher in der methanogenen Zone einer mit Kohlenwasserstoffen kontaminierten wasserführenden Bodenschicht gefunden wurde (DOJKA et al. 1998). Zu den „Sediment Archaea“ gehörten außerdem Klone einer mit den Wurzeln von Reispflanzen assoziierten Gemeinschaft, die unter anoxischen Bedingungen mit der Methanproduktion begannen (Klone ABS3, 9 und 12: GROBKOPF et al. 1998).

Unter Berücksichtigung der Tatsache, daß sich im HA-ARC-01 - Cluster der Großteil der aus dem Sedimenthorizont mit den höchsten Methanoxidationsraten stammenden Klone vereinigt und angesichts der ebenfalls in diesen Cluster fallenden (potentiell) methanogenen Referenzen, ist es wahrscheinlich, daß der HA-ARC-01 - Cluster Untergruppen methanogener Euryarchaeota enthält, die unter entsprechenden Bedingungen zur anaeroben Oxidation von Methan befähigt sind.

In Bezug auf die Zusammensetzung der Archaea-Gemeinschaft gibt es kaum Parallelen zu den von TESKE et al. (2002) untersuchten Sedimenten im Guaymas Becken. Einzig die Zugehörigkeit einiger Crenarchaeota-Klone zur Marine Group I und zur Marine Benthic Group B ist beiden Standorten gemein. Die potentiell Methan-oxidierenden Archaea aus den anoxischen Guaymas Becken - Sedimenten ordnen sich zu den bereits für eine solche Aktivität bekannten Gruppen (ANME-1 und 2). Gleichzeitig betonen die Autoren jedoch die hohe Diversität in den zur anaeroben Methanoxidation befähigten Gemeinschaften und lassen eine eventuelle Beteiligung anderer Gruppen offen (siehe auch Kap. 15.2, S. 99).

Insgesamt ist der hydrothermale Einfluß auf die Sedimente im Guaymas Becken wesentlich größer als in der Bransfield Straße, was sich in Temperaturen von bis zu 200°C widerspiegelt. Demzufolge wurden dort bei früheren Untersuchungen auch hyperthermophile Sulfatreduzierer (*Archaeoglobus*) und methanogene Archaea (*Methanopyrus* und *Methanococcus*) gefunden (BURGGRAF et al. 1990, HUBER et al. 1989 und JONES et al. 1983). Außerdem spielen in einigen Bereichen thermogen

---

gebildete höhere Kohlenwasserstoffe als Kohlenstoffquelle für bestimmte Bakteriengruppen eine signifikante Rolle (BAZYLINSKI et al. 1989).

### ***13.2.2 Eubakterien und Sulfatreduzierer***

Unter den Eubakterien-Klonen finden sich, wie schon zuvor bei den Archaea, zahlreiche bisher unbekannte Phylotypen (SÜLING unveröffentlicht). Ein großer Teil von ihnen clustert innerhalb der Deltaproteobacteria und zwar in der Nähe von kultivierten Repräsentanten der Sulfat-reduzierenden Bakterien. Dies weist darauf hin, daß die Sulfatreduktion (auch unabhängig von der anaeroben Methanoxidation) einen wichtigen mikrobiellen Prozeß in dem hier untersuchten Sediment darstellt.

## 14 Synthese

In dieser Arbeit wurde die prokaryotische Aktivität und Diversität in besonderen Tiefsee-Lebensräumen untersucht, in denen die Organismendichten für Tiefsee-Verhältnisse ungewöhnlich hoch sind. Obwohl sich die untersuchten Gebiete in ihrer geographischen Lage, wie auch in ihren individuellen Standortbedingungen unterscheiden, gibt es doch Gemeinsamkeiten. Alle drei liegen im Einflußbereich submariner Kontinentalränder, wo in Folge tektonischer Prozesse energiereiche Verbindungen (u.a. Schwefelwasserstoff und Methan) freigesetzt werden. Auch sind es an allen Standorten prokaryotische Organismen, die die im Grenzbereich zwischen Tiefenwasser und Meeresboden entstehenden chemischen Gradienten für ihren Stoffwechsel nutzen und damit die Lebensgrundlage für die dort ansässigen Organismengemeinschaften bilden. Das durch abiotische und biotische Standortfaktoren kontrollierte Stoffangebot ist hierbei maßgebend dafür, welche Prokaryoten die Schlüsselposition an diesen Bio-Geo-Schnittstellen einnehmen und welche Gruppen die Gemeinschaft dominieren.

So sind es an den warmen Quellen des Nord-Fiji-Beckens thioautotrophe Symbionten, die einen Hauptteil der bakteriellen Biomasse ausmachen und von deren Produktionsleistung dann indirekt die von heterotrophen Bakterien dominierten Plume-Gemeinschaften profitieren. Aufgrund der relativ geringen Methan-konzentrationen (HBS90:  $450 \text{ nmol l}^{-1}$ ) können sich hier aber offenbar keine Populationen methanotropher Bakterien etablieren.

Anders ist die Situation an den durch destabilisierte Gashydratlager gespeisten Cold Seeps im Gebiet des Makran-Akkretionskomplexes. Selbst in den Randbereichen der Seeps sind die maximalen Methankonzentrationen etwa 10-mal so hoch, wodurch verschiedenen Typ I Methanotrophen das Wachstum in den oxischen Oberflächensedimenten ermöglicht wird. Die Grenzschichten zu den anoxischen Seep-Bereichen sind von Matten Schwefel-oxidierender Spezies der Gattung *Thioploca* besiedelt.

Durchgehend anoxische Bedingungen herrschen im hydrothermal beeinflussten Sediment am Rande des Hook Ridge in der Bransfield Straße. Hier stellen methanoxidierende Konsortien aus „methanogenen“ Archaea und Sulfat-reduzierenden Bakterien in bestimmten Horizonten einen signifikanten Anteil der Prokaryoten-Gemeinschaft. In der Sedimentzone mit dem höchsten anaeroben Methanumsatz lagen die Methankonzentrationen mit  $730 \text{ nmol l}^{-1}$  dabei nur wenig höher als an den Fluidaustritten im Nord-Fiji-Becken.

## 15 Kritische Betrachtungen zu den Methoden und Ergebnissen

### 15.1 Bestimmung mikrobieller Aktivitäten

Die im Zuge dieser Arbeit angewandten Radiotracer-Techniken haben sich grundsätzlich als zuverlässige und sensitive Methoden zur direkten Bestimmung verschiedener mikrobieller Aktivitäten erwiesen. Bei einer vergleichenden Betrachtung der aus den hier untersuchten Tiefsee-Proben stammenden Meßwerte mit Aktivitätsdaten von anderen Standorten müssen jedoch folgende Aspekte berücksichtigt werden:

Die aus Meeres-Tiefen bis zu ca. 2000 m stammenden Proben wurden immer so schnell wie möglich bearbeitet und bei *in situ* - Temperaturen inkubiert. Da die Bearbeitung jedoch gerätetechnisch bedingt an Bord erfolgen mußte, waren die in den Proben befindlichen Organismen teilweise über eine Stunde anderen Temperatur- und Druckbedingungen als an ihrem natürlichen Lebensraum ausgesetzt. Auf eine Rekomprimierung auf *in situ* - Druck wurde verzichtet.

Außerdem erforderten die niedrigen Temperaturen im Tiefenwasser relativ lange Inkubationszeiten, wobei mit fortschreitender Inkubationsdauer generell der Einfluß von „Bottle-Effekten“ zunimmt.

Da diese Faktoren nachgewiesenermaßen einen Einfluß auf die mikrobiellen Aktivitäten haben (JANNASCH AND WIRSEN 1977, JANNASCH 1979, DE ANGELIS et al. 1991), können die vorliegenden Daten nur als gute Näherungswerte für die tatsächlichen *in situ* - Aktivitäten betrachtet werden.

### 15.2 Molekularbiologische Diversitätsanalysen

Seit ihrer Einführung als Untersuchungsmethoden in der mikrobiellen Ökologie haben molekularbiologische Ansätze zweifelsohne unser Wissen über die Strukturen von Bakteriengemeinschaften in den unterschiedlichsten Lebensräumen erheblich erweitert (MCINERNEY et al. 2001). Angesichts der mittlerweile gewonnenen Erkenntnis, daß nur etwa 1% aller natürlich vorkommenden Mikroorganismen mit Standard-Kulturmethode erfaßt werden kann (HUGENHOLTZ et al. 1998a), könnte man sogar von einem Quantensprung in der mikrobiologischen Diversitätsforschung reden. Gleichzeitig muß man sich jedoch der Tatsache bewußt sein, daß auch die molekularbiologischen Analysen uns nur ein eingeschränktes Abbild der natürlichen Diversität wiedergeben können.

Die hier für einen ersten Vergleich unter verschiedenen Umweltbedingungen lebender Bakteriengemeinschaften eingesetzte Denaturierende Gradienten Gel-Elektrophorese (DGGE) hat sich als „Fingerprinting-Tool“ bewährt. Unter Berücksichtigung der Ergebnisse der parallel durchgeführten Klonierungsexperimente wird jedoch deutlich, daß durch die DGGE-Bandenmuster nur ein sehr begrenzter, mehr oder weniger repräsentativer Ausschnitt der tatsächlich vorhandenen Artenvielfalt wiedergegeben werden kann.

Die Erstellung von Klonbibliotheken ist derzeit die einzige Methode, die dem Mikrobiologen einen einigermaßen repräsentativen Überblick über die quantitative Zusammensetzung ihm unbekannter Prokaryoten-Gemeinschaften verschafft und dabei gleichzeitig konkrete Sequenzinformationen liefert (STACKEBRANDT et al. 1999). Wie alle PCR-basierten Methoden unterliegt jedoch auch sie dem Einfluß von Fehlerquellen, die ihre Aussagekraft in Bezug auf die natürliche Diversität begrenzen (VON WINTZINGERODE et al. 1997). Die methodisch bedingten Probleme sind vielfältig und beginnen schon vor der DNA-Extraktion und enden nicht mit dem eigentlichen Klonierungsprozeß. An dieser Stelle seien daher nur einige wesentliche Aspekte erwähnt: Der bei phylogenetischen Studien im Regelfall amplifizierte 16S rDNA - Genabschnitt ist bei verschiedenen Prokaryoten in einer unterschiedlichen Anzahl von Kopien im Genom verankert. Diese Kopien weisen zudem bei einigen Arten noch eine interne Heterogenität auf (RAINEY et al. 1996). Neben der unterschiedlichen Template-Zugänglichkeit bei der Amplifikation homologer Genabschnitte aus komplexen Gemeinschaften ist die Bildung von PCR-Artefakten wie Heteroduplizaten und Chimären ein weiteres Problem (THOMPSON et al. 2002, HUGENHOLTZ AND HUBER 2003). Nach Abgleich mit Referenzsequenzen und rRNA Sekundärstrukturen wurden daher entsprechend verdächtige Sequenzen vor der phylogenetischen Analyse eliminiert. Außerdem wurden nur evaluierte Primer und optimierte PCR-Protokolle verwendet. Überschätzungen der tatsächlichen Diversität sowie Unrichtigkeiten in den quantitativen Aussagen können jedoch letztlich nicht ausgeschlossen werden.

Ein weiteres Problem bei der Auswertung der mit Hilfe der molekularbiologischen Methoden gewonnenen Daten ergab sich jedoch noch von ganz anderer Seite:

Die korrekte phylogenetische Einordnung einer Klonsequenz verhilft dem Forscher nämlich nicht zwangsläufig zu Informationen über die Eigenschaften des dahinterstehenden Organismus. Während die relativ frühe Wahrnehmung der ökologischen Bedeutung von Bakterien dazu geführt hat, daß heute neben zahlreichen Sequenzen vielfach auch dazugehörige physiologische Daten verfügbar sind, führten erst in jüngerer Zeit vorgenommene Untersuchungen zu der Erkenntnis, daß Archaea auch jenseits von extremen Lebensräumen eine signifikante Rolle spielen (DELONG 1992, DELONG et al. 1994, FUHRMAN et al. 1993, FUHRMAN AND DAVIS 1997, MASSANA et al. 1997, ARAVALLI et al. 1998). Demzufolge haben die für Archaea zur Verfügung stehenden Sequenzdaten einen

weitaus geringeren Umfang. Was jedoch schwerer wiegt, ist die Tatsache, daß die Diskrepanz zwischen der Menge an bekannten Sequenzen und der Anzahl der physiologisch charakterisierten Organismen noch erheblich größer ist als dies bei den Bakterien der Fall ist.

Außerdem sind viele physiologische Gruppen in Bezug auf ihre Evolution nicht monophyletisch, d.h. nicht alle methanogenen Archaea (*Methanobacteriales*, *Methanococcales*, *Methanomicrobiales*, *Methanosarcinales*) sind auf 16S rDNA-Ebene eng miteinander verwandt (s. Abb. 21a, S. 77), und mit methanogenen Ordnungen entfernte assoziierte Klon-Cluster verfügen nicht unbedingt über deren physiologische Eigenschaften. Umgekehrt bedeutet ein geringer Verwandtschaftsgrad nicht zwingend, daß ein Klon-Cluster keine Sequenzen von zur Methanogenese befähigten Archaea enthält (vergl. ANME-1 Group).

Im Falle der potentiell an der anaeroben Methanoxidation beteiligten Archaea (Cluster HA-ARC-01) in den Sedimenten am Hook Ridge bedeutet dies, daß ein direkter Nachweis der Zugehörigkeit zur Gruppe der Methanogenen auf der Basis der vorhandenen (Sequenz-)Information zur Zeit nicht möglich ist. Außerdem kann trotz des hohen Anteils bisher unbekannter Sequenzen an den insgesamt gefundenen Klonen nicht davon ausgegangen werden, daß es sich bei den isolierten Clustern in erster Linie um endemische Gruppen handelt, auch wenn die geographisch isolierte Lage des antarktischen Lebensraumes eine solche Vermutung nahe legen könnte. Aufgrund der bisher geringen Anzahl an Untersuchungen zur Verbreitung mariner Archaea (insbesondere im benthischen Bereich: VETRIANI et al. 1999, TESKE et al. 2002) ist eher anzunehmen, daß in Zukunft auch an Standorten mit ähnlichen Umweltbedingungen vergleichbare Gemeinschaften entdeckt werden.



## Literatur

- ABRAMS E.S. AND STANTON V.P. JR. 1992. Use of denaturing gradient gel electrophoresis to study conformational transitions in nucleic acids. *Methods Enzymol.* 212: 71-104.
- ADVANCED BIOTECHNOLOGIES LTD. 1995. Basic protocol for PCR.
- ALPERIN M.J. AND REEBURGH W.S. 1988. Carbon and hydrogen isotope fractionation resulting from anaerobic methane oxidation. *Glob. Biogeochem. Cycl.* 2: 279-288.
- ARAVALLI R.N., SHE Q. AND GARRETT R.A. 1998. Archaea and the new age of microorganisms. *Tree.* 13: 190-194.
- BAZYLINSKI D. A., WIRSEN C.O. AND JANNASCH H.W. 1989. Microbial utilization of naturally occurring hydrocarbons at the Guaymas Basin hydrothermal vent site. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 2832-2836.
- BENLLOCH S., LÓPEZ-LÓPEZ A., ØVREÅS L., GODDARD V., CASAMAYOR E.O., DAAE F.L., SMERDON G., MASSANA R., JOINT I., THINGSTAD F., PEDRÓS-ALIÓ C. AND RODRÍGUEZ-VALERA F. 2002. Prokaryotic genetic diversity throughout the salinity gradient of a coastal solar saltern. *Environ. Microbiol.* 4: 349-360.
- BODROSSY L., HOLMES E.M., HOLMES A.J., KOVÁCS K. AND MURRELL J.C. 1997. Analysis of 16S rRNA and methane monooxygenase gene sequences reveals a novel group of thermotolerant and thermophilic methanotrophs, *Methylocaldum* gen. nov. *Arch. Microbiol.* 168: 493-503.
- BOEHRINGER MANNHEIM GMBH. 1995. Boehringer PCR Applications Manual.
- BOETIUS A., RAVENSCHLAG K., SCHUBERT C., RICKERT D., WIDDEL F., GIESEKE A., AMANN R., JØRGENSEN B.B., WITTE U. AND PFANNKUCHE O. 2000. A marine microbial consortium apparently mediating anaerobic oxidation of methane. *Nature* 407: 623-626.
- BOHRMANN G., CHIN C., PETERSEN S., SAHLING H., SCHWARZ-SCHAMPERA U., GREINERT J., LAMMERS S., REHDER G., DAEHLMANN A., WALLMANN K., DIJKSTRA S. AND SCHENKE H.-W. 1999. Hydrothermal activity at Hook Ridge in the Central Bransfield Basin, Antarctica. *Geo-Mar. Lett.* 18: 277-284.

- BOROWSKI C. UND GIERE O. 2001. Bakterien-Tier-Symbiosen als Charakteristika hydrothermaler Ökosysteme. In: Hydrothermale Fluidentwicklung, Stoffbilanzierung und spezielle biologische Aktivität im Nord-Fiji-Becken, HYFIFLUX II Abschlußbericht Kapitel 7
- BOWMAN J.P., REA S.M., MCCAMMON S.A. AND MCMEEKIN T.A. 2000. Diversity and community structure within anoxic sediment from marine salinity meromictic lakes and a coastal meromictic marine basin, Vestfold Hills, Eastern Antarctica. *Environ. Microbiol.* 2: 227-237.
- BOWMAN J.P., SLY L.I. AND HAYWARD A.C. 1991. Contribution of genome characteristics to assessment of taxonomy of obligate methanotrophs. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 41: 301-305.
- BOWMAN J.P., SLY L.I. AND STACKEBRANDT E. 1995. The phylogenetic position of the family *Methylococcaceae*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45: 182-185.
- BOWMAN J.P., SLY L.I., NICHOLS P.D. AND HAYWARD A.C. 1993. Revised taxonomy of the methanotrophs: Description of *Methylobacter* gen. nov., emendation of *Methylococcus*, validation of *Methylosinus* and *Methylocystis* species, and a proposal that the family *Methylococcaceae* includes only the group I methanotrophs. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 43: 735-753.
- BURG J.-P. 2003. Großräumige Strukturen und Plattentektonik. Vorlesungsskript. Strukturgeologie, Universität Zürich.
- BURGGRAF S., JANNASCH H.W., NICOLAUS B. AND STETTER K.O. 1990. *Archaeoglobus profundus* sp. nov. represents a new species within the sulfate-reducing archaeobacteria. *Syst. Appl. Microbiol.* 13: 24-28.
- BURNS S.J. 1998. Carbon isotopic evidence for coupled sulfate reduction-methane oxidation in Amazon Fan sediments. *Geochim. Cosmochim. Acta* 62: 797-804.
- CANGANELLA F., JONES W.J., GAMBACORTA A. AND ANTRANIKIAN G. 1997. Biochemical and phylogenetic characterization of two novel deep-sea *Thermococcus* isolates with potentially biotechnological applications. *Arch. Microbiol.* 167: 233-238.
- CASAMAYOR E.O., MUYZER G. AND PEDRÓS-ALIÓ C. 2001. Composition and temporal dynamics of planktonic archaeal assemblages from anaerobic sulfurous environments studied by 16S rDNA denaturing gradient gel electrophoresis and sequencing. *Aquat. Microb. Ecol.* 25: 237-246.

- CHEN L.S., FIGUEREDO A., PEDROSA F.O. AND HUNGRIA M. 2000. Genetic characterization of soybean rhizobia in Paraguay. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 5099-5103.
- CHILDRESS J.J., FELBECK H. UND SOMERO G.N. 1991. Symbiose in der Tiefsee. In: *Biologie der Meere*. Spektrum Akad. Verl., Heidelberg. pp. 94-100.
- CHRISTEN H.R. 1984. *Chemie*. Diesterweg/Salle-Sauerländer, Frankfurt am Main.
- COMITA P.B. AND GAGOSIAN R.B. 1984. Suspended particulate organic material from hydrothermal vent waters at 21°N. *Nature* 307: 450-453.
- CORRE E., REYSENBACH A.-L. AND PRIEUR D. 2001. Epsilon-proteobacterial diversity from a deep-sea hydrothermal vent on the Mid-Atlantic Ridge. *FEMS Microbiol. Lett.* 205: 329-335.
- COSTELLO A.M. AND LIDSTROM M.E. 1999. Molecular characterization of functional and phylogenetic genes from natural populations of methanotrophs in lake sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 5066-5074.
- COWEN J.P., WEN X. AND POPP B.N. 2002. Methane in aging hydrothermal plumes. *Geochim. Cosmochim. Acta* 66: 3563-3571.
- DE ANGELIS M.A., BAROSS J.A. AND LILLEY M.D. 1991. Enhanced microbial methane oxidation in water from a deep-sea hydrothermal vent field at simulated *in situ* hydrostatic pressures. *Limnol. Oceanogr.* 36: 565-570.
- DE ANGELIS M.A., LILLEY M.D., OLSON E.J. AND BAROSS J.A. 1993. Methane oxidation in deep-sea hydrothermal plumes of the Endeavour Segment of the Juan de Fuca Ridge. *Deep-Sea Res.* 40: 1169-1186.
- DELONG E.F. 1992. Archaea in coastal marine environments. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 5685-5689.
- DELONG E.F. 2000. Resolving a methane mystery. *Nature* 407: 577-579.
- DELONG E.F., WU K.Y., PRHELIN B.B. AND JOVINE R.V.M. 1993. High abundance of archaea in antarctic marine picoplankton. *Nature* 371: 695-697.
- DESBROYÈRES D., ALMEIDA A., BISCOITO M., COMTET T., KHRIPOUNOFF A., LES BRIS N., SARRADIN P.M. AND SEGONZAC M. 2000. A review of the distribution of hydrothermal vent communities along the northern Mid-Atlantic-Ridge: Dispersal vs. environmental controls. *Hydrobiol.* 440: 201-216.

- DISTEL D.L. AND CAVANAUGH C.M. 1994. Independent phylogenetic origins of methanotrophic and chemoautotrophic bacterial endosymbioses in marine bivalves. *J. Bacteriol.* 176: 1932-1938.
- DOJKA M.A., HUGENHOLTZ P., HAACK S.K. AND PACE N.R. 1998. Microbial diversity in a hydrocarbon- and chlorinated-solvent-contaminated aquifer undergoing intrinsic bioremediation. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 3869-3877.
- DON R.H., COX P.T., WAINWRIGHT B.J., BAKER K. AND MATTICK J.S. 1991. Touchdown PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucleic Acids Res.* 19: 4008.
- EDER W., LUDWIG W. AND HUBER R. 1999. Novel 16S rRNA gene sequences retrieved from highly saline brine sediments of Kebrit Deep, Red Sea. *Arch. Microbiol.* 172 : 213-218.
- ELVERT M., SUESS E., GREINERT J. AND WHITICAR J. 2000. Archaea mediating anaerobic methane oxidation in deep-sea sediments at cold seeps of the eastern aleutian subduction zone. *Org. Geochem.* 31: 1175-1187.
- FAHEY R.C. AND NEWTON G.L. 1987. Determination of low molecular-weight thiols using monobromobimane fluorescent labelling and high-performance liquid chromatography. *Meth. Enzymol.* 143: 85-96.
- FELSENSTEIN J. 1989. PHYLIP – Phylogeny inference package (version 3.2). *Cladistics* 5: 164-166.
- FISCHER S.G. AND LERMAN L.S. 1979. Length-independent separation of DNA restriction fragments in two dimensional gel electrophoresis. *Cell* 16: 191-200.
- FISCHER S.G. AND LERMAN L.S. 1983. DNA fragments differing by single basepair substitutions are separated in denaturing gradient gels : Correspondence with melting theory. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 1579-1583.
- FOX G.E, WISOTZKEY J.D. AND JURTSCHUK P.JR. 1992. How close is close: 16S rRNA sequence identity may not be sufficient to guarantee species identity. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 42: 166-170.
- FUHRMAN J.A. AND AZAM F. 1982. Thymidine incorporation as a measure of heterotrophic bacterioplankton production in marine surface waters: Evaluation and field results. *Mar. Biol.* 66: 109-120.
- FUHRMAN J.A. AND DAVIS A.A. 1997. Archaea and novel bacteria from the deep sea as shown by 16S rRNA gene sequences. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 150: 275-285.

- FUHRMAN J.A., MCCALLUM K. AND DAVIS A.A. 1993. Phylogenetic diversity of subsurface marine microbial communities from the Atlantic and Pacific Oceans. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 1294-1302.
- FUJIWARA Y., TAKAI K., UEMATSU K., TSUCHIDA S., HUNT J.C. AND HASHIMOTO J. 2000. Phylogenetic characterization of endosymbionts in three hydrothermal vent mussels: Influence on host distributions. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 208: 147-155.
- GARRITY G.M., WINTERS M. AND SEARLES D.B. 2001. Taxonomic outline of the procaryotic genera. Release 1.0, April 2001. *Bergey's manual of systematic bacteriology*, second edition. Springer-Verlag, New York.
- GREVEMEYER I., ROSENBERGER A. AND VILLINGER H. 2000. Natural gas hydrates on the continental slope off Pakistan: Constraints from seismic techniques. *Geophys. J. Int.* 140: 295-310.
- GROBKOPF R., STUBNER S., AND LIESACK W. 1998. Novel euryarchaeotal lineages detected on rice roots and in the anoxic bulk soil of flooded rice microcosms. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 4983-4989.
- HAGSTRÖM A., POMMIER T., ROHWER F., SIMU K., STOLTE W., SVENSSON D. AND ZWEIFEL U.L. 2002. Use of 16S ribosomal DNA for delineation of marine bacterioplankton species. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 3628-3633.
- HALBACH P., HOLZBECHER E., KOSCHINSKY A., MICHAELIS W. AND SEIFERT R. 2001. Deep-sea hydrothermal microplume generation – a case study from the North Fiji Basin. *Geo-Mar. Lett.* 21: 94-102.
- HANSON R.S. AND HANSON T.E. 1996. Methanotrophic bacteria. *Microbiol. Rev.* 60: 439-471.
- HANSSON I. 1973. A new set of acidity constants for carbonic acid and boric acid in sea water. *Deep-Sea Res.* 20: 461-478.
- HARDER J. 1997. Anaerobic methane oxidation by bacteria employing  $^{14}\text{C}$ -methane uncontaminated with  $^{14}\text{C}$ -carbon monoxide. *Mar. Geol.* 137: 13-23.
- HARWOOD C.S., JANNASCH H.W. AND CANALE-PAROLA E. 1982. Anaerobic spirochete from a deep-sea hydrothermal vent. *Appl. Environ. Microbiol.* 42: 234-237.
- HINRICHS K.-U., HAYES J.M., SYLVA S.P., BREWER P.G. AND DELONG E.F. 1999. Methane-consuming archaeobacteria in marine sediments. *Nature* 398: 802-805.

- HOBBIE J.E., DALEY R.J. AND JASPER S. 1977. Use of nucleopore filters for counting bacteria by fluorescence microscopy. *Appl. Environ. Microbiol.* 33: 1225-1228.
- HOEHLER T.M., ALPERIN M.J., ALBERT D.B. AND MARTENS C.S. 1994. Field and laboratory studies of methane oxidation in an anoxic marine sediment: Evidence for a methanogen - sulfate reducer consortium. *Glob. Biogeochem. Cycl.* 8: 451-463.
- HORITA J. AND BERNDT M.E. 1999. Abiogenic methane formation and isotopic fractionation under hydrothermal conditions. *Science* 285: 1055-1057.
- HUBER J.A., BUTTERFIELD D.A. AND BAROSS J.A. 2002. Temporal changes in archaeal diversity and chemistry in a mid-ocean ridge seafloor habitat. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 1585-1594.
- HUBER R., KURR M., H. JANNASCH H.W. AND STETTER K.O. 1989. A novel group of abyssal methanogenic archaeobacteria (*Methanopyrus*) growing at 110°C. *Nature* 342: 833-834.
- HUGENHOLTZ P. AND HUBER T. 2003. Chimeric 16S rDNA sequences of diverse origin are accumulating in the public databases. *Int. J. Syst. Evolution. Microbiol.* 53: 289-293.
- HUGENHOLTZ P., GOEBEL B.M. AND PACE N.R. 1998a. Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *J. Bacteriol.* 180: 4765-4774.
- HUGENHOLTZ P., PITULLE C., HERSHBERGER K. L. AND PACE N.R. 1998. Novel division level bacterial diversity in a Yellowstone hot spring. *J. Bacteriol.* 180: 366-376.
- HUGHES J.B., HELLMANN J.J., RICKETTS T.H. AND BOHANNAN B.J.M. 2001. Counting the uncountable: Statistical approaches to estimating microbial diversity. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 4399-4406.
- INAGAKI F., SAKIHAMA Y., INOUE A., KATO C. AND HORIKOSHI K. 2002. Molecular phylogenetic analyses of reversetranscribed bacterial rRNA obtained from deep-sea cold seep sediments. *Environ. Microbiol.* 4: 277-286.
- IVERSEN N. AND JØRGENSEN B.B. 1985. Anaerobic methane oxidation rates at the sulfate-methane transition in marine sediments from Kattegat and Skagerrak (Denmark). *Limnol. Oceanogr.* 30: 944-955.

- JAHNKE L.L., SUMMONS R.E., HOPE J.M. AND DES MARAIS D.J. 1999. Carbon isotopic fractionation in lipids from methanotrophic bacteria II: The effects of physiology and environmental parameters on the biosynthesis and isotopic signatures of biomarkers. *Geochim. Cosmochim. Acta* 63: 79-93.
- JANNASCH H.W. 1979. Microbial turnover of organic matter in the deep sea. *BioScience* 29: 228-232.
- JANNASCH H.W. 1985. Leben in der Tiefsee auf chemosynthetischer Basis. *Naturwissenschaften* 72: 285-290.
- JANNASCH H.W. 1986. Leben in der Tiefsee: Neue Forschungsergebnisse. *Verhandlungen der Gesellschaft deutscher Naturforscher und Ärzte* 114: 353-373.
- JANNASCH H.W. AND MOTTL M.J. 1985. Geomicrobiology of deep-sea hydrothermal vents. *Science* 229: 717-725.
- JANNASCH H.W. AND TAYLOR C.D. 1984. Deep-sea microbiology. *Ann. Rev. Microbiol.* 38: 487-514.
- JANNASCH H.W. AND WIRSEN C.O. 1979. Chemosynthetic primary production at east pacific sea floor spreading centers. *BioScience* 29: 592-598.
- JANNASCH H.W. AND WIRSEN C.O. 1981. Microbiological survey of microbial mats near deep-sea thermal vents. *Appl. Environ. Microbiol.* 41: 528-538.
- JANNASCH H.W. UND WIRSEN C.O. 1977. Microbial life in the deep sea. *Scientific American* 236: 42-52.
- JONES W.J., LEIGH J.A., MAYER F., WOESE C.R. AND WOLFE R.S. 1983. *Methanococcus jannaschii* sp. nov., an extremely thermophilic methanogen from a submarine hydrothermal vent. *Arch. Microbiol.* 136: 254-261.
- KARL D.M. 1995. Ecology of free-living, hydrothermal vent microbial communities. In: *The microbiology of deep-sea hydrothermal vents*. CRC Press, New York. pp. 35-124.
- KARL D.M., WIRSEN C.O. AND JANNASCH H.W. 1980. Deep-sea primary production at the Galápagos hydrothermal vents. *Science* 207: 1345-1347.
- KENNETT J.P. 2002. Role of methane hydrates in global climate change. In: *Report of the methane advisory committee on methane issues and opportunities*, December 2002. pp. B1-B44.

- KOSCHINSKY A., SEIFERT R., HALBACH P., BAU M., BRASSE S., DECARVALHO L.M. AND FONSECA N.M. 2002. Geochemistry of diffuse low-temperature hydrothermal fluids in the North Fiji Basin. *Geochim. Cosmochim. Acta* 66: 1409-1427.
- LEFF L.G., DANA J.R., MCARTHUR J.V. AND SHIMKETS L.J. 1995. Comparison of methods of DNA extraction from stream sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 1141-1143.
- LERMAN A. 1979. Geochemical processes. In: *Water and sediment environments*. Wiley, New York.
- LI L., GUEZENNEC J., NICHOLS P., HENRY P., YANAGIBAYASHI M. AND KATO C. 1999. Microbial diversity in Nankai Trough sediments at a depth of 3,843 m. *J. Oceanogr.* 55: 635-642.
- LI L., KATO C. AND HORIKOSHI K. 1999. Bacterial diversity in deep-sea sediments from different depths. *Biodivers. Conserv.* 8: 659-677.
- LI L., KATO C. AND HORIKOSHI K. 1999a. Microbial diversity in sediments collected from the deepest cold-seep area, the Japan Trench. *Mar. Biotechnol.* 1: 391-400.
- LLANOS J., CAPASSO C., PARISI E., PRIEUR D. AND JEANTHON C. 2000. Susceptibility to heavy metals and cadmium accumulation in aerobic and anaerobic thermophilic microorganisms isolated from deep-sea hydrothermal vents. *Curr. Microbiol.* 41: 201-205.
- LONGNECKER K. AND REYSENBACH A.-L. 2001. Expansion of the geographic distribution of a novel lineage of epsilon-proteobacteria to a hydrothermal vent site on the southern East Pacific Rise. *FEMS Microbiol. Ecol.* 35: 287-293.
- MADIGAN M.T., MARTINKO J.M. AND PARKER J. 2001. *Brock – Mikrobiologie. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.*
- MANTOVANI E., VITI M., BABBUCCI D., TAMBURELLI C. AND ALBARELLO D. 2001. Back arc extension: which driving mechanism? In: *Journal of the Virtual Explorer. General contributions: 2001.* JESSELL M.W. (ed.). 3: 17-45.
- MASSANA R., MURRAY A.E., PRESTON C.M. AND DELONG E.F. 1997. Vertical distribution and phylogenetic characterization of marine planktonic archaea in the Santa Barbara Channel. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 50-56.

- MCCOLLOM T.M. AND SHOCK E.L. 1997. Geochemical constraints on chemolithoautotrophic metabolism by microorganisms in seafloor hydrothermal systems. *Geochim. Cosmochim. Acta* 20: 4375-4391.
- MCINERNEY J.O., MULLARKEY M., WERNECKE M.E., AND POWELL R. 2001. Bacteria and Archaea: Molecular techniques reveal astonishing diversity. *Biodiversity* 3: 3-10.
- MICHAELIS W., SEIFERT R., NAUHAUS K., TREUDE T., THIEL V., BLUMENBERG M., KNITTEL K., GIESEKE A., PETERKNECHT K., PAPE T., BOETIUS A., AMANN R., JØRGENSEN B.B., WIDDEL F., PECKMANN J., PIMENOV N.V. AND GULIN M.B. 2002. Microbial reefs in the Black Sea fueled by anaerobic oxidation of methane. *Science* 297: 1013-1015.
- MURRELL J.C. AND HOLMES A.J. 1995. Molecular ecology of marine methanotrophs. *NATO ASI Ser. G38*: 365-390.
- MUYZER G., DE WAAL E.C. AND UITTERLINDEN A.G. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 695-700.
- MUYZER G., TESKE A., WIRSEN C.O. AND JANNASCH H.W. 1995. Phylogenetic relationships of *Thiomicrospira* species and their identification in deep-sea hydrothermal vent samples by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rDNA fragments. *Arch. Microbiol.* 164: 165-172.
- MYERS R.M., FISCHER S.G., LERMAN L.S. AND MANIATIS T. 1985. Nearly all single base substitutions in DNA fragments joined to a GC-clamp can be detected by denaturing gradient gel electrophoresis. *Nucleic Acids Res.* 13: 3131-3145.
- MYERS R.M., MANIATIS T. AND LERMAN L.S. 1987. Detection and localization of single base changes by DGGE. *Methods Enzymol.* 155: 501-527.
- NAGANUMA T. AND SEKI H. 1994. Microbial populations of hydrothermal fluid and plumes in the North Fiji Basin with reference to chemosynthesis. *Mar. Geol.* 116: 243-253.
- NAGANUMA T., OTSUKI A. AND SEKI H. 1989. Abundance and growth rate of bacterioplankton community in hydrothermal vent plumes of the North Fiji Basin. *Deep-Sea Res.* 36: 1379-1390.

- NAUHAUS K., BOETIUS A., KRÜGER M. AND WIDDEL F. 2002. *In vitro* demonstration of anaerobic oxidation of methane coupled to sulphate reduction in sediment from a marine gas hydrate area. *Environ. Microbiol.* 4: 296-305.
- NEWTON G.L., DORIAN R. AND FAHEY R.C. 1981. Analysis of biological thiols: Derivatisation with monobromobimane and separation by reverse-phase high-performance liquid chromatography. *Anal. Biochem.* 114: 383-387.
- ORPHAN V.J., HINRICHS K.-U., USSLER III W., PAULL C.K., TAYLOR L.T., SYLVA S.P., HAYES J.M. AND DELONG E.F. 2001. Comparative analysis of methane-oxidizing archaea and sulphate-reducing bacteria in anoxic marine sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 1922-1934.
- ORPHAN V.J., HOUSE C.H., HINRICHS K.-U., MCKEEGAN K.D. AND DELONG E.F. 2002. Multiple archaeal groups mediate methane oxidation in anoxic cold seep sediments. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 7663-7668.
- PANCOST R.D., SINNINGHE DAMSTÉ J.S., DE LINT S., VAN DER MAAREL J.E.C., GOTTSCHAL J.C. AND THE MEDINAUT SHIPBOARD SCIENTIFIC PARTY. 2000. Biomarker evidence for widespread anaerobic methane oxidation in mediterranean sediments by a consortium of methanogenic archaea and bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 1126-1132.
- PETRI R. AND IMHOFF J.F. 2001. Genetic analysis of sea-ice bacterial communities of the Western Baltic Sea using an improved double gradient method. *Polar Biol.* 24: 252-257.
- PHELPS C. D., KERKHOF L.J. AND YOUNG L.Y. 1998. Molecular characterization of a sulfate-reducing consortium which mineralizes benzene. *FEMS Microbiol. Ecol.* 27: 269-279.
- PODGORSEK L., PETRI R. AND IMHOFF J.F. 2004. Cultured and genetic diversity, and activities of sulfur-oxidizing bacteria in low-temperature hydrothermal fluids of the North Fiji Basin. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 266: 65-76.
- POND D.W., BELL M.V., DIXON D.R., FALICK A.E., SEGONZAC M. AND SARGENT J.R. 1998. Stable-carbon-isotope composition of fatty acids in hydrothermal vent mussels containing methanotrophic and thiotrophic bacterial endosymbionts. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 370-375.
- PYSKLYWEC R.N., MITROVICA J.X. AND ISHII M. 2003. Mantle avalanche as a driving force for tectonic reorganization in the southwest Pacific. *Earth Planet. Sci. Lett.* 209: 29-38.

- RADFORD-KNOERY J., CHARLOU J.-L., DONVAL J.-P., ABALLÉA M., FOUQUET Y. AND ONDRÉAS H. 1998. Distribution of dissolved sulfide, methane, and manganese near the seafloor at the Lucky Strike (37°17'N) and Menez Gwen (37°50'N) hydrothermal vent sites on the mid-Atlantic Ridge. *Deep-Sea Res.* 45: 367-386.
- RAGUENES G., PIGNET P., GAUTHIER G., PERES A., CHRISTEN R., ROUGEAUX H., BARBIER G. AND GUEZENNEC J. 1996. Description of a new polymer-secreting bacterium from a deep-sea hydrothermal vent, *Alteromonas macleodii* subsp. *fijiensis*, and preliminary characterization of the polymer. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 67-73.
- RAINEY F.A., WARD-RAINEY N.-L., JANSSEN P.H., HIPPE H. AND STACKEBRANDT E. 1996. *Clostridium paradoxum* DSM 7308<sup>T</sup> contains multiple 16S rRNA genes with heterogeneous intervening sequences. *Microbiology* 142: 2087-2095.
- RAVENSCHLAG K., SAHM K., PERNTHALER J. AND AMANN R. 1999. High bacterial diversity in permanently cold marine sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 3982-3989.
- REYSENBACH A.-L., LONGNECKER K. AND KIRSHTEN J. 2000. Novel bacterial and archaeal lineages from an *in situ* growth chamber deployed at a Mid-Atlantic Ridge hydrothermal vent. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 3798-3806.
- RUBY E.G., WIRSON C.O. AND JANNASCH H.W. 1981. Chemolithotrophic sulphur-oxidizing bacteria from the Galapagos Rift hydrothermal vents. *Appl. Environ. Microbiol.* 42: 317-324.
- RUMJANEK N.G., DOBERT R.C., VAN BERKUM P. AND TRIPLETT E.W. 1993. Common soybean inoculant strains in Brazil are members of *Bradyrhizobium elkanii*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 4371-4373.
- SAIKI R.K., RANDALL K., GELFAND D.H., STOFFEL S., SCHARF S.J., HIGUCHI R., HORN G.T., MULLIS K.B. AND ERLICH H.A. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-491.
- SCHLEGEL H.G. 1992. *Allgemeine Mikrobiologie*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- SCHLOSSER P., SUESS E., BAYER R. AND RHEIN M. 1988. <sup>3</sup>He in the Bransfield Strait waters: Indication for local injection from backarc rifting. *Deep-Sea Res.* 35: 1919-1935.

- SCHMALJOHANN R., DREWS M., WALTER S., LINKE P., VON RAD U. AND IMHOFF J.F. 2001. Oxygen- minimum zone sediments in the northeastern Arabian Sea off Pakistan: A habitat for the bacterium *Thioploca*. Mar. Ecol. Prog. Ser. 211: 27-42.
- SHEFFIELD V.C., COX D.R., LERMAN L.S. AND MYERS R.M. 1989. Attachment of a 40-base pair G+C-rich sequence (GC-clamp) to genomic DNA fragments by the polymerase chain reaction results in improved detection of single-base changes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 232-236.
- SHERWOOD LOLLAR B., WESTGATE T.D., WARD J.A., SLATER G.F. AND LACRAMPE- COULOUME G. 2002. Abiogenic formation of alkanes in the earth's crust as a minor source for global hydrocarbon reservoirs. Nature 416: 522-524.
- SIMON M. AND AZAM F. 1989. Protein content and protein synthesis rates of planktonic marine bacteria. Mar. Ecol. Prog. Ser. 51: 201-213.
- SMITH K.S., COSTELLO A.M. AND LIDSTROM M.E. 1997. Methane and trichloroethylene oxidation by an estuarine methanotroph, *Methylobacter* sp. Strain BB5.1. Appl. Environ. Microbiol. 63: 4617-4620.
- STACKEBRANDT E., PUKALL R., ULRICHS G. AND RHEIMS H. 1999. Analysis of 16S rDNA clone libraries: Part of the big picture. Methods of microbial community analysis. In: Microbial biosystems: New frontiers. Proceedings of the 8th international symposium on microbial ecology. BELL C.R., BRYLINSKY M. AND JOHNSON-GREEN P. (eds.). Atlantic Canada Society for Microbial Ecology, Halifax, Canada.
- STRUNK O., GROSS O., REICHEL B., MAY M., HERMANN S., STUCKMAN N., NONHOFF B., LENKE M., GINHART A., VILBIG A., LUDWIG T., BODE A., SCHLEIFER K.-H. AND LUDWIG W. 1998. ARB: A software environment for sequence data. Department of Microbiology, Technische Universität München. Munich, Germany.
- SUESS E., BOHRMANN G., GREINERT J. UND LAUSCH E. 1999. Brennendes Eis - Methanhydrat am Meeresgrund. Spektr. Wiss. 6: 62-73.
- SUESS E., FISK M., AND KADKO D. 1987. Thermal interaction between backarc volcanism and basin sediments in the Bransfield Strait, Antarctica. Antarc. J. U.S. 22: 46-49.
- TAKAI K. AND HORIKOSHI K. 1999. Genetic diversity of archaea in deep-sea hydrothermal vent environments. Genetics 152: 1285-1297.

- TESKE A., DHILLON A. AND SOGIN M.L. 2003. Genomic markers of ancient anaerobic microbial pathways: Sulfate reduction, methanogenesis, and methane oxidation. *Biol. Bull.* 204: 186-191.
- TESKE A., HINRICHS K-U., EDGCOMB V., DE VERA GOMEZ A., KYSELA D., SYLVA S.P., SOGIN M.L. AND JANNASCH H.W. 2002. Microbial diversity of hydrothermal sediments in the Guaymas Basin: Evidence for anaerobic methanotrophic communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 1994-2007.
- THIEL V., PECKMANN J., SEIFERT R., WEHRUNG P., REITNER J. AND MICHAELIS W. 1999. Highly isotopically depleted isoprenoids: molecular markers for ancient methane venting. *Geochim. Cosmochim. Acta* 63: 3959-3966.
- THOMPSON J.D., GIBSON T.J., PLEWNIAC F., JEANMOUGIN F. AND HIGGINS D.G. 1997. The ClustalX windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 24: 4876-4882.
- THOMPSON J.D., HIGGINS D.G. AND GIBSON T.J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22: 4673-4680.
- THOMPSON J.R., MARCELINO L.A. AND POLZ M.F. 2002. Heteroduplexes in mixed-template amplifications: Formation, consequence and elimination by 'reconditioning PCR'. *Nucleic Acids Res.* 30: 2083-2088.
- TRENT J.D. 2000. Extremophiles in astrobiology: Per ardua ad astra Grav. *Space Biol. Bull.* 13: 5-11.
- TSAI Y.L. AND OLSON B.H. 1991. Rapid method for direct extraction of DNA from soil and sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 1070-1074.
- TSUNOGAI U., YOSHIDA N., ISHIBASHI J. AND GAMO T. 2000. Carbon isotopic distribution of methane in deep-sea hydrothermal plume, Myojin Knoll Caldera, Izu-Bonin arc: Implications for microbial methane oxidation in the oceans and applications to heat flux estimation. *Geochim. Cosmochim. Acta* 14: 2439-2452.
- TUNNICLIFFE V. 1991. The biology of hydrothermal vents: Ecology and evolution. *Oceanogr. Mar. Biol. Annu. Rev.* 29: 319-407.
- TURLEY C.M. AND HUGHES D.J. 1992. Effects of storage on direct estimates of bacterial numbers of preserved seawater samples. *Deep-Sea Res.* 39: 375-394.

- UTSUMI M., KOJIMA S., NOJIRI Y., OHTA S. AND SEKI H. 1994. Biomass and production of bacterioplankton at the hydrothermal vent areas in the rift system of the North Fiji Basin. *J. Oceanogr.* 50: 635-642.
- VANDOVER C.L., GERMAN C.R., SPEER K.G., PARSON A.M. AND VRIJENHOEK R.C. 2002. Evolution and biogeography of deep-sea vent and seep invertebrates. *Science* 295: 1253-1257.
- VETRIANI C., JANNASCH H.W., MACGREGOR B.J., STAHL D.A. AND REYSENBACH A.-L. 1999. Population structure and phylogenetic characterization of marine benthic archaea in deep-sea sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 4375-4384.
- VON RAD U., BERNER U., DELISLE G., DOOSE-ROLINSKI H., FECHNER N., LINKE P., LÜCKGE A., ROESER H.A., SCHMALJOHANN R. AND WIEDICKE M. 2000. Gas and fluid venting at the Makran accretionary wedge off Pakistan. *Geo-Mar. Lett.* 20: 10-19.
- VON WINTZINGERODE F., GÖBEL U.B. AND STACKEBRANDT E. 1997. Determination of microbial diversity in environmental samples: Pitfalls of PCR-based rRNA analysis. *FEMS Microbiol. Rev.* 21: 213-229.
- WEISS B.P., YUNG Y.L. AND NEALSON K.H. 2000. Atmospheric energy for subsurface life on Mars? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 1395-1399.
- WELHAN J.A. AND CRAIG H. 1979. Methane and hydrogen in East Pacific Rise hydrothermal fluids. *Geophys. Res. Lett.* 6: 829-831.
- WHITTENBURY R., PHILLIPS K.C. AND WILKINSON J.G. 1970. Enrichment, isolation and some properties of methane utilizing bacteria. *J. Gen. Microbiol.* 61: 205-218.
- WINN C.D. AND KARL D.M. 1986. Microorganisms in deep-sea hydrothermal plumes. *Nature* 320: 744-746.
- ZHOU J., BRUNS M.A. AND TIEDJE J.M. 1996. DNA recovery from soils of diverse composition. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 316-322.

# Anhang

## 16 Medien

### 16.1 Mineralmedien zur Anreicherung und Isolierung methanotropher Bakterien

Nitrat-Mineralsalz-Medium (NMS)

Ammonium-Mineralsalz-Medium (AMS)

Ammonium/Nitrat-Mineralsalz-Medium (ANMS)

*Komponenten für je 1000 ml Medium:*

1,0 g             $\text{KNO}_3$  (NMS) bzw. 0,5 g  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (AMS)  
                     bzw. 0,5 g  $\text{KNO}_3$  + 0,5 g  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (ANMS)

25 g             $\text{NaCl}$

1,0 g             $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$

0,22 g           $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$

10 ml          100 x Phosphatpuffer

1,0 ml          Spurenelementlösung

0,5 ml          Molybdatlösung

0,1 ml          NaFe EDTA Lösung

mit aqua dest. auf 1000 ml auffüllen

*Molybdatlösung (100 ml):*

0,1 g Natriummolybdat in 100 ml aqua dest.

*NaFe EDTA Lösung (100 ml):*

3,8 g NaFe EDTA in 100 ml aqua dest.

*Spurenelementlösung (1000 ml):*500 mg       $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ 400 mg       $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ 

250 mg      EDTA

50 mg         $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ 20 mg         $\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$ 15 mg         $\text{H}_3\text{BO}_3$ 10 mg         $\text{NiCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ 

mit aqua dest. auf 1000 ml auffüllen

*100x Phosphatpuffer (100 ml):*1,0 g         $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 5,0 g         $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 

Mit Ausnahme des Phosphatpuffers können alle Komponenten vor dem Autoklavieren zusammengegeben werden. Die Einstellung des korrekten pH-Wertes (pH 7,3) erfolgt durch die Zugabe von 10 ml des getrennt autoklavierten Phosphatpuffers.

## 16.2 Im Rahmen der Klonierungsexperimente verwendete Medien

### *SOC-Medium:*

2%	Trypton
0,5%	Hefeextrakt
10 mM	NaCl
2,5 mM	KCl
10 mM	MgCl <sub>2</sub>
10 mM	MgSO <sub>4</sub> ,
20 mM	Glukose

### *LB (Luria-Bertani) Kanamycin Agar Platten:*

1%	Trypton
0,5%	Hefe-Extrakt
1%	NaCl
50 µg/l	Kanamycin

pH 7 bei 20°C

## 17 Puffer

*10x Standard Phosphatpuffer (PBS-Puffer):*

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 11,502 g/l

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2,042 g/l

NaCl: 80,063 g/l

KCl 2,013 g/l

autoklaviertes „Milli-Q Wasser“

pH 7,4 bei 20°C

*10x PCR Reaktionspuffer für Red Hot - Polymerase:*

(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 200 mM

Tris-HCl 750 mM

Tween 20 0,1 Vol%

MgCl<sub>2</sub> 15 mM

DNA-freies Wasser

pH 8,8 bei 25°C

*10x Tris-Borat-EDTA Elektrophoresepuffer (TBE-Puffer):*

C<sub>4</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>3</sub> 108,990 g/l

H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 55,647 g/l

C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub>NH<sub>2</sub> x 2H<sub>2</sub>O 3,722 g/l

autoklaviertes „Milli-Q Wasser“

pH 8,0 bei 20°C

*20 x Tris-Acetat-EDTA Elektrophoresepuffer (TAE-Puffer):*

C<sub>4</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>3</sub>      193,760    g/l

C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>O<sub>2</sub>Na      65,624    g/l

C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub>NH<sub>2</sub> x 2H<sub>2</sub>O      22,332    g/l

autoklaviertes „Milli-Q Wasser“

pH 7,4 bei 20°C

## **18 Denaturierungslösungen für die DGGE**

*200 ml 0% Denaturierungslösung (6% Acrylamid):*

30 ml      40% 37,5 : 1 Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung

5 ml      20 x TAE-Puffer

165 ml    autoklaviertes „Milli-Q Wasser“

*100 ml 100% Denaturierungslösung (8% Acrylamid):*

20 ml      40% 37,5 : 1 Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung

2,5 ml    20x TAE-Puffer

42 g      Harnstoff

40 ml      Formamid (deionisiert mit Mixed Bed Resin, Fa. Sigma)

mit autoklaviertem „Milli-Q Wasser“ auf 100 ml auffüllen

## 19 Ergebnisse der Datenbankvergleiche

Die Ergebnisse der Datenbankvergleiche (FASTA3) für die aus den Klonierungsexperimenten hervorgegangenen Klon-Sequenzen werden hier in tabellarischer Form dargestellt. Dabei enthalten die einzelnen Tabellenspalten die folgenden Informationen:

**Klon** = Klonbezeichnung

**%-Id.** = Sequenzidentität mit der nächstähnlichen Datenbanksequenz

**Nächstähnliche Sequenz** = Datenbanksequenz mit der höchsten Sequenzidentität

**ACC-Nr.** = Accession Number der nächstähnlichen Datenbanksequenz

**Autor/Datum** = Name der Person, die die Sequenz in die Datenbank gestellt hat und Jahr in dem dies geschehen ist  
(Sofern publiziert, auch Name des Erst-Autors)

Die Informationen zusätzlich zur Sequenzidentität mit der nächstähnlichen Datenbanksequenz sind nur oberhalb eines bestimmten Schwellenwertes angegeben (Bakterien-Klone: 95%, Archaea-Klone: 90% oder 95%), da bei niedrigen Sequenzidentitäten (unterhalb von 90%) keine sinnvollen Aussagen mehr gemacht werden können.

### 19.1 Klonierungsexperimente Nord-Fiji-Becken (Bakterien)

**Tabelle A1.** Ergebnisse des FASTA-Datenbankvergleichs für die aus dem Klonierungsexperiment *Station MS55* hervorgegangenen Klonsequenzen

Nr.	Klon	%-Id.	Nächstähnliche Sequenz	ACC-Nr.	Autor/Datum
1	f13ae-c00	99,448	<i>Afipia genospecies 1 G6457</i>	U87762	Whitney, 97
2	f13ae-c01	99,853	<i>Bradyrhizobium elkanii</i> USDA 86	AF293379	vanBerkum, 02
3	f13ae-c04	89			
4	f13ae-c05	94,595			
5	f13ae-c06	99,714	<i>Afipia genospecies 1 G6457</i>	U87762	Whitney, 97
6	f13ae-c07	99,708	<i>Uncult. eubac. clone GL182.19</i>	AY038616	Vescio, 01
7	f13ae-c08	99,711	<i>Uncult. eubac. clone GL182.19</i>	AY038616	Vescio, 01
8	f13ae-c10	99,440	<i>Alphaproteobacterium GMD37F2</i>	AY162082	Zengler, 02
9	f13ae-c12	98,703	<i>Uncult. Saccharococcus species</i>	AJ306648	Yakimov, 01
10	f13ae-c13	99,878	<i>Bradyrhizobium elkanii</i> USDA 86	AF293379	vanBerkum, 02
11	f13ae-c14	99,694	<i>Bradyrhizobium elkanii</i> USDA 86	AF293379	vanBerkum, 02
12	f13ae-c18	99,881	<i>Bradyrhizobium elkanii</i> USDA 86	AF293379	vanBerkum, 02
13	f13ae-c20	100	<i>Bradyrhizobium elkanii</i> USDA 86	AF293379	vanBerkum, 02
14	f13ae-c22	100	<i>Bradyrhizobium elkanii</i> USDA 86	AF293379	vanBerkum, 02
15	f13ae-c23	97,337	<i>Paracoccus zeaxanthinifaciens</i>	AF461159	Berry, 02
16	f13ae-c24	99,858	<i>Soil DNB bacterium G14003</i>	AB003458	Saito, 98
17	f13ae-c25	92,500			
18	f13ae-c27	99,718	<i>Bradyrhizobium elkanii</i> USDA 86	AF293379	vanBerkum, 02
19	f13ae-c28	98,640	<i>Uncult. Saccharococcus species</i>	AJ306648	Yakimov, 01
20	f13ae-c29	99,591	<i>Uncult. bacterium</i>	AF382108	Fuchs, 01
21	f13ae-c30	92,935			
22	f13ae-c31	99,881	<i>Bradyrhizobium elkanii</i> USDA 86	AF293379	vanBerkum, 02
23	f13ae-c33	99,876	<i>Bradyrhizobium elkanii</i> USDA 86	AF293379	vanBerkum, 02
24	f13ae-c34	99,685	<i>Bradyrhizobium elkanii</i> USDA 86	AF293379	vanBerkum, 02
25	f13ae-c35	99,864	<i>Propionibacterium acnes</i>	AB097215	lida, 02
26	f13ae-c36	93,750			
27	f13ae-c38	98,454	<i>Citromicrobium bathoceanense</i>	Y16267	Yurkov, 00
28	f13ae-c39	91,382			

Fortsetzung auf der nächsten Seite

Fortsetzung von Tabelle A1

Nr.	Klon	%-Id.	Nächstähnliche Sequenz	ACC-Nr.	Autor/Datum
29	f13ae-c40	99,739	<i>Uncult. bacterium</i>	AF382108	Fuchs, 01
30	f13ae-c41	99,730	<i>Bradyrhizobium elkanii</i> USDA 86	AF293379	vanBerkum, 02
31	f13ae-c42	100	<i>Bradyrhizobium elkanii</i> USDA 86	AF293379	vanBerkum, 02
32	f13ae-c44	92,572			
33	f13ae-c45	99,733	<i>Uncult. bacterium</i>	AF382108	Fuchs, 01
34	f13ae-c46	92,194			
35	f13ae-c47	100	<i>Bradyrhizobium elkanii</i> USDA 86	AF293379	vanBerkum, 02
36	f13ae-c48	98,887	<i>Alphaproteobacterium</i> MBIC3030	AB008814	Hamada, 02
37	f13ae-c49	99,446	<i>Uncult. bacterium</i>	AF382108	Fuchs, 01
38	f13ae-c51	99,588	<i>Halomonas meridiana</i>	AJ306891	Arahal, 02
39	f13ae-c53	99,756	<i>Uncult. bacterium</i>	AF382108	Fuchs, 01
40	f13ae-c54	99,444	<i>Methylobacterium</i> sp. PC30.39	Z23158	Hugenholtz, 02
41	f13ae-c55	98,029	<i>Uncult. CFB group clone TAF-B8</i>	AY038771	O'Sullivan, 02
42	f13ae-c56	99,588	<i>Alphaproteobacterium</i> MBIC3030	AB008814	Hamada, 02
43	f13ae-c57	93,957			
44	f13ae-c58	99,598	<i>Uncult. bacterium</i>	AF382108	Fuchs, 01
45	f13ae-c59	99,860	<i>Bradyrhizobium elkanii</i> USDA 86	AF293379	vanBerkum, 02
46	f13ae-c60	98,374	<i>Arthrobacter psychrolactophilus</i>	AF134183	Loveland, 02
47	f13ae-c61	98,887	<i>Alphaproteobacterium</i> MBIC3030	AB008814	Hamada, 02
48	f13ae-c62	99,726	<i>Uncult. bacterium</i>	AF382108	Fuchs, 01
49	f13ae-c64	96,033			
50	f13ae-c65	99,862	<i>Uncult. bacterium</i>	AF382108	Fuchs, 01
51	f13ae-c66	99,723	<i>Uncult. bacterium</i>	AF382108	Fuchs, 01
52	f13ae-c68	76			
53	f13ae-c69	94,610			
54	f13ae-c70	98,915	<i>Mar. Gammaproteobac. DHB-2</i>	AF257292	Lopez, 01
55	f13ae-c71	100	<i>Bradyrhizobium elkanii</i> USDA 86	AF293379	vanBerkum, 02
56	f13ae-c73	99,604	<i>Methylobacterium</i> sp. G296-5	AF395035	Christner, 01
57	f13ae-c77	99,447	<i>Uncult. bacterium</i>	AF382108	Fuchs, 01
58	f13ae-c78	99,723	<i>Uncult. bacterium</i>	AF382108	Fuchs, 01
59	f13ae-c79	97,123			
60	f13ae-c80	99,336	<i>Halomonas meridiana</i>	AJ306891	Arahal, 02

Fortsetzung auf der nächsten Seite

Fortsetzung von Tabelle A1

Nr.	Klon	%-Id.	Nächstähnliche Sequenz	ACC-Nr.	Autor/Datum
61	f13ae-c81	98,291	<i>Citromicrobium bathoceanense</i>	Y16267	Yurkov, 00
62	f13ae-c82	100	<i>Soil DNB bacterium G14003</i>	AB003458	Saito, 98
63	f13ae-c83	100	<i>Uncult. eubac. clone GL182.19</i>	AY038616	Vescio, 01
64	f13ae-c84	92,215			
65	f13ae-c86	97,636			
66	f13ae-c87	99,588	<i>Uncult. bacterium</i>	AF382108	Fuchs, 01
67	f13ae-c88	100	<i>Bradyrhizobium elkanii</i> USDA 86	AF293379	vanBerkum, 02
68	f13ae-c90	98,825	<i>Mar. Gammaproteobac. DHB-2</i>	AF257292	Lopez, 01
69	f13ae-c91	99,570	<i>Methylobacterium</i> sp. G296-5	AF395035	Christner, 01
70	f13ae-c93	99,862	<i>Uncult. bacterium</i>	AF382108	Fuchs, 01
71	f13ae-c97	93,804			
72	f13ae-c99	91,793			

**Tabelle A2.** Ergebnisse des FASTA-Datenbankvergleichs für die aus dem Klonierungsexperiment *Station HBS90* hervorgegangenen Klonsequenzen

Nr.	Klon	%-Id.	Nächstähnliche Sequenz	ACC-Nr.	Autor/Datum
1	f16ae-c00	98,966	<i>Marine bacterium SCRIPPS_101</i>	AF359537	Hold, 01
2	f16ae-c01	99,728	<i>Blastomonas natatoria</i>	AB024288	Hiraishi, 00
3	f16ae-c02	98,936	<i>Flavobacterium</i> sp. AS-40	AJ391201	Schaefer, 00
4	f16ae-c03	97,858	<i>Uncult. hydrocarbon seep bac.</i>	AF154101	O'Neill, 99
5	f16ae-c04	90,528			
6	f16ae-c05	97,721	<i>Unid. actinomycete strain BD2-10</i>	AB015539	Kato, 99
7	f16ae-c06	85			
8	f16ae-c07	98,765	<i>Mar. Alphaproteobac. BB2AT3</i>	AF365991	Long, 01
9	f16ae-c09	90,272			
10	f16ae-c10	92,649			
11	f16ae-c11	87			
12	f16ae-c12	90,885			
13	f16ae-c13	90,854			
14	f16ae-c14	95,093	<i>Marine bacterium ATAM407_62</i>	AF359530	Hold, 01
15	f16ae-c15	100	<i>Blastobacter</i> sp. SMCC B0477	U20772	Fredrickson,99
16	f16ae-c16	91,281			
17	f16ae-c17	88,000			
18	f16ae-c18	90,271			
19	f16ae-c19	93,250			
20	f16ae-c20	91,978			
21	f16ae-c21	89			
22	f16ae-c22	95,602	<i>Betaproteobacterium B6</i>	AF035052	Kalmbach, 01
23	f16ae-c23	97,711	<i>Uncult. proteobac. isolate a1b001</i>	AF420344	Teske, 02
24	f16ae-c24	91,185			
25	f16ae-c25	99,412	<i>Gammaproteobac. NAC60-12</i>	AF245652	Gonzalez, 00
26	f16ae-c26	98,566	<i>Uncult. bacterium clone pBSB5.28</i>	AB062164	Inagaki, 02
27	f16ae-c27	85			
28	f16ae-c28	95,232	<i>Rubrivivax gelatinosus</i>	AB016167	Nagashima, 98
29	f16ae-c30	94,737			

Fortsetzung auf der nächsten Seite

Fortsetzung von Tabelle A2

Nr.	Klon	%-Id.	Nächstähnliche Sequenz	ACC-Nr.	Autor/Datum
30	f16ae-c31	90,235			
31	f16ae-c32	86			
32	f16ae-c33	92,143			
33	f16ae-c34	90,590			
34	f16ae-c35	86			
35	f16ae-c37	87			
36	f16ae-c39	99,293	<i>Roseobacter</i> sp. MED6	AF025549	Hagstrom, 00
37	f16ae-c40	88			
38	f16ae-c42	97,554	<i>Epsilonproteobac. strain NKB8</i>	AB013260	Kato, 00
39	f16ae-c44	96,543	<i>Uncult. mar. bacterium ZD0255</i>	AJ400343	Fuchs, 00
40	f16ae-c46	97,418	<i>Gammaproteobac. NAC60-12</i>	AF245652	Gonzalez, 00
41	f16ae-c48	88			
42	f16ae-c49	92,899			
43	f16ae-c50	88			
44	f16ae-c51	91,221			
45	f16ae-c53	86,000			
46	f16ae-c54	98,527	<i>Erythrobacter</i> sp. SCB26	U64003	Pinhassi, 99
47	f16ae-c55	90,301			
48	f16ae-c56	95,531	<i>Marine bacterium Y4I</i>	AF388307	Buchan, 01
49	f16ae-c58	89			
50	f16ae-c59	93,289			
51	f16ae-c60	88			
52	f16ae-c62	95,349	<i>Epsilonproteobac. R76-B61</i>	AF449248	Lopez, 02
53	f16ae-c66	86			
54	f16ae-c67	97,170	<i>Unid. bacterium strain R7091</i>	AJ278783	Mergaert, 01
55	f16ae-c68	90			
56	f16ae-c70	98,804	<i>Uncult. bacterium clone pBSB5.28</i>	AB062164	Inagaki, 02
57	f16ae-c73	91,944			
58	f16ae-c74	96,542	<i>Marine Alphaproteobac. SB11</i>	AF365998	Long, 01
59	f16ae-c75	93,256			
60	f16ae-c77	93,423			

Fortsetzung auf der nächsten Seite

Fortsetzung von Tabelle A2

Nr.	Klon	%-Id.	Nächstähnliche Sequenz	ACC-Nr.	Autor/Datum
61	f16ae-c78	82			
62	f16ae-c79	99,712	<i>Blastomonas natatoria</i>	AB024288	Hiraishi, 00
63	f16ae-c81	90			
64	f16ae-c82	96,557	<i>Mar. Alphaproteobacterium SB11</i>	AF365998	Long, 01
65	f16ae-c83	96,406	<i>Uncult. bacterium clone CS2.28</i>	AB069789	Inagaki, 02
66	f16ae-c84	97,453	<i>Uc. OP8 bac. clone R76-B102</i>	AF449263	Lopez, 02
67	f16ae-c86	90,784			
68	f16ae-c87	92,756			
69	f16ae-c88	99,745	<i>Blastomonas natatoria</i>	AB024288	Hiraishi, 00
70	f16ae-c89	96,466	<i>Betaproteobacterium B6</i>	AF035052	Kalmbach, 01
71	f16ae-c91	93,506			
72	f16ae-c92	99,629	<i>Mar. bacterium SCRIPPS_739</i>	AF359546	Hold, 01
73	f16ae-c93	90			
74	f16ae-c94	99,701	<i>Erythrobacter flavus strain SW-46</i>	AF500004	Yoon, 02
75	f16ae-c95	98,499	<i>Epsilonproteobac. strain NKB9</i>	AB013261	Kato, 00
76	f16ae-c96	97,836	<i>Gammaproteobac. CTD12B</i>	AF469313	Huber, 02
77	f16ae-c97	93,707			
78	f16ae-c98	90,759			
79	f16ae-c99	89			

## 19.2 Klonierungsexperimente Bransfield Straße (Archaea)

**Tabelle A3.** Ergebnisse des FASTA-Datenbankvergleichs für die aus dem Klonierungsexperiment *Sedimenthorizont HA5* hervorgegangenen Klonsequenzen

Nr.	Klon	%-Id.	Nächstähnliche Sequenz	ACC-Nr.	Autor/Datum
1	ha5arc-c00	79			
2	ha5arc-c01	82			
3	ha5arc-c02	84			
4	ha5arc-c03	72			
5	ha5arc-c04	84			
6	ha5arc-c05	85			
7	ha5arc-c06	79			
8	ha5arc-c08	83			
9	ha5arc-c09	89			
10	ha5arc-c10	84			
11	ha5arc-c11	86			
12	ha5arc-c12	74			
13	ha5arc-c13	85			
14	ha5arc-c14	82			
15	ha5arc-c15	87			
16	ha5arc-c16	82			
17	ha5arc-c17	91			
18	ha5arc-c18	85			
19	ha5arc-c19	85			
20	ha5arc-c20	84			
21	ha5arc-c21	84			
22	ha5arc-c22	77			
23	ha5arc-c23	83			
24	ha5arc-c24	85			
25	ha5arc-c25	84			
26	ha5arc-c26	85			
27	ha5arc-c27	85			
28	ha5arc-c28	78			

Fortsetzung auf der nächsten Seite

Fortsetzung von Tabelle A3

Nr.	Klon	%-Id.	Nächstähnliche Sequenz	ACC-Nr.	Autor/Datum
29	ha5arc-c29	83			
30	ha5arc-c30	85			
31	ha5arc-c31	79			
32	ha5arc-c32	99,154	<i>Uncult. mar. archaeon TS235C306</i>	AF052948	v.d. Maarel, 98
33	ha5arc-c33	86			
34	ha5arc-c34	80			
35	ha5arc-c35	77			
36	ha5arc-c36	86			
37	ha5arc-c37	84			
38	ha5arc-c38	87			
39	ha5arc-c39	85			
40	ha5arc-c40	86			
41	ha5arc-c41	84			
42	ha5arc-c42	78			
43	ha5arc-c43	83			
44	ha5arc-c44	82			
45	ha5arc-c45	84			
46	ha5arc-c46	88			
47	ha5arc-c47	85			
48	ha5arc-c48	86			
49	ha5arc-c49	84			
50	ha5arc-c50	85			
51	ha5arc-c51	95,312	<i>Uncult. archaeon clone 2-PML</i>	AF477913	Benlloch, 02
52	ha5arc-c52	85			
53	ha5arc-c54	86			
54	ha5arc-c55	84			
55	ha5arc-c56	81			
56	ha5arc-c57	78			
57	ha5arc-c58	84			
58	ha5arc-c59	93,235	<i>Uncult. archaeon clone 2-PML</i>	AF477913	Benlloch, 02
59	ha5arc-c60	86			
60	ha5arc-c61	86			

Fortsetzung auf der nächsten Seite

Fortsetzung von Tabelle A3

Nr.	Klon	%-Id.	Nächstähnliche Sequenz	ACC-Nr.	Autor/Datum
61	ha5arc-c62	83			
62	ha5arc-c63	74			
63	ha5arc-c64	81			
64	ha5arc-c65	87			
65	ha5arc-c66	85			
66	ha5arc-c67	91,067	<i>Uncult. euryarchaeote VAL35-1</i>	AJ131278	Jurgens, 00
67	ha5arc-c68	86			
68	ha5arc-c69	76			
69	ha5arc-c70	86			
70	ha5arc-c71	95,551	<i>Uncult. euryarchaeote VAL90</i>	AJ131271	Jurgens, 00
71	ha5arc-c72	76			
72	ha5arc-c73	85			
73	ha5arc-c74	84			
74	ha5arc-c75	98,947	<i>Uncult. mar. archaeon TS235C306</i>	AF052948	v.d. Maarel, 98
75	ha5arc-c77	83			
76	ha5arc-c78	86			
77	ha5arc-c79	86			
78	ha5arc-c80	85			
79	ha5arc-c81	83			
80	ha5arc-c82	86			
81	ha5arc-c83	87			
82	ha5arc-c87	100	<i>Uncult. archaeon CS_R008</i>	AF419646	Teske, 02
83	ha5arc-c88	82			
84	ha5arc-c89	84			
85	ha5arc-c90	76			
86	ha5arc-c91	79			
87	ha5arc-c92	83			
88	ha5arc-c93	78			
89	ha5arc-c94	83			
90	ha5arc-c95	83			
91	ha5arc-c96	83			
92	ha5arc-c97	85			
93	ha5arc-c98	85			
94	ha5arc-c99	86			

**Tabelle A4.** Ergebnisse des FASTA-Datenbankvergleichs für die aus dem Klonierungsexperiment *Sedimenthorizont HA7* hervorgegangenen Klonsequenzen

Nr.	Klon	%-Id.	Nächstähnliche Sequenz	ACC-Nr.	Autor/Datum
1	ha7arc-c00	85			
2	ha7arc-c02	99,384	<i>Uncult. archaeon CRA4-23cm</i>	AF119132	Vetriani, 99
3	ha7arc-c03	85			
4	ha7arc-c04	91,250			
5	ha7arc-c05	98,295	<i>Unid. archaeon clone pMC2A203</i>	AB019737	Takai, 99
6	ha7arc-c06	99,420	<i>Uncult. archaeon CRA8-23cm</i>	AF119133	Vetriani, 99
7	ha7arc-c07	83			
8	ha7arc-c09	79			
9	ha7arc-c10	84			
10	ha7arc-c11	99,384	<i>Uncult. archaeon CRA4-23cm</i>	AF119132	Vetriani, 99
11	ha7arc-c12	97,947	<i>Uncult. archaeon CRA8-27cm</i>	AF119128	Vetriani, 99
12	ha7arc-c13	97,951	<i>Uncult. archaeon CRA8-27cm</i>	AF119128	Vetriani, 99
13	ha7arc-c14	98,788	<i>Uncult. archaeon clone 63-A18</i>	AJ305078	Schaefer, 02
14	ha7arc-c15	94,715			
15	ha7arc-c16	81			
16	ha7arc-c17	85			
17	ha7arc-c18	99,185	<i>Uncult. archaeon CRA8-23cm</i>	AF119133	Vetriani, 99
18	ha7arc-c19	98,982	<i>Uncult. archaeon CRA4-23cm</i>	AF119132	Vetriani, 99
19	ha7arc-c20	98,971	<i>Uncult. archaeon CRA8-23cm</i>	AF119133	Vetriani, 99
20	ha7arc-c21	87			
21	ha7arc-c22	82			
22	ha7arc-c23	76			
23	ha7arc-c24	85			
24	ha7arc-c25	92,184			
25	ha7arc-c26	82			
26	ha7arc-c27	82			
27	ha7arc-c28	85			
28	ha7arc-c29	82			
29	ha7arc-c30	82			
30	ha7arc-c31	95,872	<i>Uncult. euryarchaeote VAL90</i>	AJ131271	Jurgens, 00
31	ha7arc-c32	99,165	<i>Uncult. archaeon CRA8-23cm</i>	AF119133	Vetriani, 99

Fortsetzung auf der nächsten Seite

Fortsetzung von Tabelle A4

Nr.	Klon	%-Id.	Nächstähnliche Sequenz	ACC-Nr.	Autor/Datum
32	ha7arc-c33	79			
33	ha7arc-c34	92,100			
34	ha7arc-c35	94,856			
35	ha7arc-c36	83			
36	ha7arc-c37	85			
37	ha7arc-c38	98,954	<i>Uncult. archaeon CRA8-23cm</i>	AF119133	Vetriani, 99
38	ha7arc-c39	95,190	<i>Uncult. archaeon clone 2-PML</i>	AF477913	Benlloch, 02
39	ha7arc-c40	98,954	<i>Uncult. archaeon CRA8-23cm</i>	AF119133	Vetriani, 99
40	ha7arc-c41	99,179	<i>Uncult. archaeon clone OHKA1.30</i>	AB094526	Inagaki, 02
41	ha7arc-c42	84			
42	ha7arc-c43	84			
43	ha7arc-c44	78			
44	ha7arc-c45	80			
45	ha7arc-c46	89			
46	ha7arc-c47	98,969	<i>Uncult. archaeon clone OHKA1.30</i>	AB094526	Inagaki, 02
47	ha7arc-c48	99,587	<i>Uncult. archaeon BURTON20_A</i>	AF142982	Bowman, 01
48	ha7arc-c49	99,578	<i>Uncult. archaeon CRA8-23cm</i>	AF119133	Vetriani, 99
49	ha7arc-c50	98,793	<i>Uncult. archaeon clone OHKA1.30</i>	AB094526	Inagaki, 02
50	ha7arc-c51	85			
51	ha7arc-c52	79			
52	ha7arc-c53	81			
53	ha7arc-c54	99,582	<i>Uncult. archaeon CRA8-23cm</i>	AF119133	Vetriani, 99
54	ha7arc-c55	99,372	<i>Uncult. archaeon CRA4-23cm</i>	AF119132	Vetriani, 99
55	ha7arc-c56	99,379	<i>Uncult. archaeon BURTON20_A</i>	AF142982	Bowman, 01
56	ha7arc-c57	99,591	<i>Uncult. archaeon CRA8-23cm</i>	AF119133	Vetriani, 99
57	ha7arc-c58	86			
58	ha7arc-c59	94,781			
59	ha7arc-c60	99,374	<i>Uncult. archaeon CRA8-23cm</i>	AF119133	Vetriani, 99
60	ha7arc-c61	82			
61	ha7arc-c62	98,778	<i>Uncult. archaeon clone OHKA1.30</i>	AB094526	Inagaki, 02
62	ha7arc-c63	85			
63	ha7arc-c64	77			

Fortsetzung auf der nächsten Seite

Fortsetzung von Tabelle A4

Nr.	Klon	%-Id.	Nächstähnliche Sequenz	ACC-Nr.	Autor/Datum
64	ha7arc-c65	86			
65	ha7arc-c66	86			
66	ha7arc-c67	84			
67	ha7arc-c68	82			
68	ha7arc-c69	76			
69	ha7arc-c70	90			
70	ha7arc-c71	85			
71	ha7arc-c72	76			
72	ha7arc-c73	82			
73	ha7arc-c74	91,875			
74	ha7arc-c75	79			
75	ha7arc-c76	99,577	<i>Uncult. archaeon CRA4-23cm</i>	AF119132	Vetriani, 99
76	ha7arc-c77	77			
77	ha7arc-c78	98,312	<i>Uncult. archaeon clone OHKA2.14</i>	AB094531	Inagaki, 02
78	ha7arc-c79	99,588	<i>Uncult. archaeon CRA4-23cm</i>	AF119132	Vetriani, 99
79	ha7arc-c80	90			
80	ha7arc-c81	84			
81	ha7arc-c82	99,179	<i>Uncult. archaeon clone OHKA1.30</i>	AB094526	Inagaki, 02
82	ha7arc-c83	99,578	<i>Uncult. archaeon CRA4-23cm</i>	AF119132	Vetriani, 99
83	ha7arc-c84	85			
84	ha7arc-c85	85			
85	ha7arc-c86	99,010			
86	ha7arc-c87	94,908			
87	ha7arc-c88	99,582	<i>Uncult. archaeon CRA8-23cm</i>	AF119133	Vetriani, 99
88	ha7arc-c89	99,010	<i>Uncult. archaeon clone OHKA1.30</i>	AB094526	Inagaki, 02
89	ha7arc-c90	90			
90	ha7arc-c91	79			
91	ha7arc-c92	90			
92	ha7arc-c93	90			
93	ha7arc-c94	99,008	<i>Uncult. archaeon clone OHKA1.30</i>	AB094526	Inagaki, 02
94	ha7arc-c96	99,582	<i>Uncult. archaeon CRA4-23cm</i>	AF119132	Vetriani, 99
95	ha7arc-c97	77			
96	ha7arc-c98	82			
97	ha7arc-c99	80			

**Tabelle A5.** Ergebnisse des FASTA-Datenbankvergleichs für die aus dem Klonierungsexperiment *Sedimenthorizont HA9* hervorgegangenen Klonsequenzen

Nr.	Klon	%-Id.	Nächstähnliche Sequenz	ACC-Nr.	Autor/Datum
1	ha9arc-c01	96,000			
2	ha9arc-c04	96,104			
3	ha9arc-c05	98,684	<i>Uncult. archaeon CRA36-0cm</i>	AF119131	Vetriani, 99
4	ha9arc-c06	99,142	<i>Uncult. archaeon BURTON20_A</i>	AF142982	Bowman, 00
5	ha9arc-c07	94,298			
6	ha9arc-c08	85			
7	ha9arc-c09	99,329	<i>Uncult. archaeon CRA4-23cm</i>	AF119132	Vetriani, 99
8	ha9arc-c10	93,750			
9	ha9arc-c11	75			
10	ha9arc-c12	82			
11	ha9arc-c13	84			
12	ha9arc-c14	82			
13	ha9arc-c15	98,261	<i>Uncult. archaeon clone OHKA2.14</i>	AB094531	Inagaki, 02
14	ha9arc-c17	99,348	<i>Uncult. archaeon CRA8-23cm</i>	AF119133	Vetriani, 99
15	ha9arc-c18	90			
16	ha9arc-c19	83			
17	ha9arc-c20	99,355	<i>Uncult. archaeon BURTON20_A</i>	AF142982	Bowman, 00
18	ha9arc-c21	99,348	<i>Uncult. archaeon CRA4-23cm</i>	AF119132	Vetriani, 99
19	ha9arc-c22	96,336			
20	ha9arc-c23	75			
21	ha9arc-c24	82			
22	ha9arc-c25	82			
23	ha9arc-c26	99,565	<i>Uncult. archaeon CRA8-23cm</i>	AF119133	Vetriani, 99
24	ha9arc-c27	75			
25	ha9arc-c28	99,348	<i>Uncult. archaeon CRA8-23cm</i>	AF119133	Vetriani, 99
26	ha9arc-c29	99,565	<i>Uncult. archaeon CRA8-23cm</i>	AF119133	Vetriani, 99
27	ha9arc-c30	99,565	<i>Uncult. archaeon CRA4-23cm</i>	AF119132	Vetriani, 99
28	ha9arc-c31	75			
29	ha9arc-c32	98,246	<i>Uncult. archaeon 19b-52</i>	AJ294873	Brehmer, 02

Fortsetzung auf der nächsten Seite

Fortsetzung von Tabelle A5

Nr.	Klon	%-Id.	Nächstähnliche Sequenz	ACC-Nr.	Autor/Datum
30	ha9arc-c33	85			
31	ha9arc-c34	99,564	<i>Uncult. archaeon CRA4-23cm</i>	AF119132	Vetriani, 99
32	ha9arc-c36	84			
33	ha9arc-c37	83,000			
34	ha9arc-c38	99,138	<i>Uncult. archaeon CRA4-23cm</i>	AF119132	Vetriani, 99
35	ha9arc-c39	94,518			
36	ha9arc-c40	77			
37	ha9arc-c41	80			
38	ha9arc-c42	96,732			
39	ha9arc-c43	99,570	<i>Uncult. archaeon BURTON20_A</i>	AF142982	Bowman,00
40	ha9arc-c44	99,565	<i>Uncult. archaeon CRA4-23cm</i>	AF119132	Vetriani, 99
41	ha9arc-c45	99,140	<i>Uncult. archaeon BURTON20_A</i>	AF142982	Bowman,00
42	ha9arc-c47	76			
43	ha9arc-c48	84			
44	ha9arc-c50	77			





# *Danksagung*

Zuerst danke ich Herrn Prof. Dr. Imhoff, der es mir ermöglicht hat, innerhalb mehrerer Projekte bei der Erforschung faszinierender Tiefseelebensräume mitzuwirken. Ich bedanke mich für das in diesem Zusammenhang entgegengebrachte Vertrauen und den Freiraum bei der Gestaltung meiner Arbeit.

Weiterhin danke ich den (teilweise ehemaligen) Mitarbeitern der Arbeitsgruppe „Mikrobielle Ökologie“:

Herrn Dr. Gocke und Frau Dr. Podgorsek, die mich auf der HYFLUX II - Fahrt begleitet haben.

Herrn Dr. Süling und Herrn Dr. Stöhr für ihre spontane Hilfsbereitschaft auch in kritischen Situationen.

Meinen „Mit-Doktoranden“ Manuela Drews, Boris Alexander, Vanessa Grabowski und Martina Blümel für die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Den Technikern Frank Lappe und Regine Wicher sowie Frau Reuter für die zuverlässige Abwicklung all meiner Bestellungen.

Besonderer Dank gilt meinen Kollegen in der Hohenbergstraße: Herrn Dr. Schmaljohann, Regine Koppe und Herrn Prof. Dr. Hoppe, mit denen ich mich auch über die wissenschaftliche Arbeit hinaus verbunden fühle. Außerdem danke ich meinen fleißigen „Hiwis“ Anke Krey und Marcus Tank, die mich bei den aufwendigen Sequenzierungsarbeiten unterstützt haben.

Ferner möchte ich mich bei Andrea Koschinsky für die gute Zusammenarbeit im Rahmen des HYFILUX II - Projektes und bei Frank-Oliver Glöckner für seine Unterstützung beim „Kampf mit dem mächtigen Arb“ bedanken.

Die letzten Dankesworte richten sich an meine Eltern, Winfried und Heike Weitzel, die mir in jeder Situation ein Rückhalt waren.



## **Der Autor**

*Björn Martin Weitzel*

Studium der Biologie an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Diplomarbeit in der Abteilung für Marine Mikrobiologie  
des Instituts für Meereskunde in Kiel:

„Untersuchungen zur Struktur und Funktion des Bakterioplanktons  
in der Kieler Bucht: Ein molekularbiologischer Ansatz“

Diplom in Biologie

mit Biologischer Meereskunde als Haupt- und Mikrobiologie als Zusatzfach

Wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Arbeitsgruppe „Mikrobielle Ökologie“  
am Leibniz-Institut für Meereswissenschaften in Kiel.

## **Erklärung**

Hiermit erkläre ich, daß ich die vorliegende Dissertation nach Form und Inhalt, abgesehen von der Beratung durch meine akademischen Lehrer, selbständig angefertigt und außer den angegebenen keine weiteren Hilfsmittel verwendet habe.

Kiel, den 21.07.04

---