

**Mikrobiologische Studien zur  
anaeroben Oxidation von Methan (AOM)**

Dissertation

Zur

Erlangung des Grades eines  
Doktors der Naturwissenschaften

- Dr. rer. nat. -

Dem Fachbereich Biologie/Chemie der  
Universität Bremen vorgelegt von

Katja Nauhaus

Bremen 2003

Die Untersuchungen zur vorliegenden Doktorarbeit wurden in der Zeit von Juni 2000 bis Oktober 2003 am Max-Planck-Institut für Marine Mikrobiologie in Bremen durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Friedrich Widdel, Universität Bremen
2. Gutachterin: Prof. Dr. Antje Boetius, Internationale Universität Bremen (IUB)

Tag des Promotionskolloquiums: 26.11.2003

# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen

Zusammenfassung 1

## **Teil I: Mikrobiologische Studien zur anaeroben Oxidation von Methan (AOM)**

<b>A</b>	<b>Einleitung</b>	4
	1. Ursprung und Kreislauf von Methan auf der Erde	5
	2. Die Bildung von Methan	7
	3. Methan in marinen Habitaten	8
	4. Die mikrobiologische Oxidation von Methan	9
	4.1. Die aerobe Oxidation von Methan	9
	4.2. Die anaerobe Oxidation von Methan	11
	5. Die an AOM beteiligten Mikroorganismen	12
	6. Thermodynamik der anaeroben Oxidation von Methan über Syntrophie in einem Konsortium	14
	7. Die Kultivierung von Mikroorganismen und das Paradigma der Reinkultur	18
	8. Die untersuchten Standorte	20
	8.1. Der Hydratrücken vor der Küste Oregons, USA	20
	8.2. Das nordwestliche Schelf des Schwarzen Meeres	22
	9. Die Ziele der vorliegenden Arbeit	24
<b>B</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion</b>	
	1. Anaerobe Oxidation von Methan in verschiedenen Mikrohabitaten des Hydratrückens	25
	1.1. AOM in Oberflächensedimenten	25
	1.2. AOM in tieferen gashydrathaltigen Sedimentschichten	28
	1.3. AOM in Gashydraten	29

2. Der Einfluss physikalischer und chemischer Parameter auf die AOM	30
3. Versuche zur Interaktion der an der AOM beteiligten Organismen	34
4. Isolierung und Wachstum von Organismen aus Proben mit AOM	37
4.1. Sulfat-Reduktionsraten und Wachstum von methanotrophen Konsortien vom Hydratrücken	37
4.2. Wachstum anaerob methanotropher Organismen aus dem Schwarzen Meer	42
4.3. Isolierung von Sulfat-Reduzierern und Methanogenen aus Habitaten mit AOM	43
4.4. Co-Kulturversuche	45
5. Kohlenstoff-Fraktionierung während der anaeroben Oxidation von Methan	45
6. Ausblick	48
<b>C Literaturverzeichnis</b>	49

<b>Teil II:</b>	<b>Publikationen</b>	
<b>A</b>	<b>Publikationsliste mit Erläuterungen</b>	63
<b>B</b>	<b>Publikationen</b>	
<b>1</b>	<i>In vitro</i> demonstration of anaerobic oxidation of methane coupled to sulphate reduction in sediment from a marine gas hydrate area	65
<b>2</b>	Microbial reefs in the Black Sea fueled by anaerobic oxidation of methane	94
<b>3</b>	Environmental regulation of anaerobic oxidation of methane mediated by ANME-I- and ANME-II- communities: a comparative analysis	118
<b>4</b>	<i>In vitro</i> growth of anaerobic consortia of Archaea and sulphate-reducing-bacteria with methane as the sole electron donor	147

## Abkürzungen

ANME	<b>anaerob</b> er <b>Methan</b> -Oxidierer
ANME647	FISH Sonde spezifisch für ANME-2a
ANME622	FISH Sonde spezifisch für ANME-2c
atm	Atmosphäre
AOM	<b>anaerobe Oxidation</b> von <b>Methan</b>
BES	Bromoethansulfonat
d	Tag
$\delta^{13}\text{C}$	Isotopenverhältnis $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$
DAPI	4',6-Diamino-2-phenylindol
DGGE	<b>Denaturierende Gradienten Gelelektrophorese</b>
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
DSS658	FISH Sonde spezifisch für <i>Desulfosarcina/Desulfococcus</i> und andere
<i>et al.</i>	
FISH	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung
$\Delta G$	Gibbs freie Energie
$\Delta G^\circ$	Gibbs freie Energie bei Standardbedingungen
$g_{\text{dw}}$	Gram Trockengewicht
K	Kelvin
kJ	Kilojoule
ln	der natürliche Logarithmus
MPa	Megapascal
$\bullet\text{OH}$	freies Hydroxylradikal
pMMO	partikuläre Methan Monooxygenase
PCR	Polymerase Ketten Reaktion ( <b>polymerase chain reaction</b> )
ppmv	parts per million bezogen auf das Volumen
R	allgemeine Gaskonstante
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure

sd	Standardabweichung (standard deviation)
sMMO	gelöste (soluble) Methan Monooxygenase
SRB	Sulfat reduzierende Bakterien
T (K)	absolute Temperatur (in Kelvin)
Tg	Teragram
v/v	Volumenprozent





## Zusammenfassung

In den letzten Jahren haben biogeochemische und molekularökologische Arbeiten zur anaeroben Oxidation von Methan (AOM) viele neue Erkenntnisse zu diesem global relevanten Prozess des Kohlenstoffkreislaufs erbracht. Physiologische Aspekte der AOM hingegen blieben weitgehend ungeklärt. In der vorliegenden Arbeit wurde der Prozess der anaeroben Oxidation von Methan erstmals in Inkubationsexperimenten im Labor untersucht, was grundlegende physiologische Einblicke erlaubte. Auch die Anreicherung anaerob Methan oxidierender Organismen wurde dadurch ermöglicht.

**1** An Sedimentproben vom Hydratrücken konnte erstmals die direkte Abhängigkeit der Sulfat-Reduktion von Methan als Elektronendonator gezeigt werden, da nur in Inkubationen mit Methan aus der Reduktion von Sulfat Sulfid gebildet wurde, nicht aber in Kontrollexperimenten ohne Methan. Die Bildung von Sulfid aus der Reduktion von Sulfat verhielt sich dabei in einem molaren Verhältnis von 1:1 zu der Oxidation von Methan.

**2** Die Bestimmung der vertikalen Verteilung der Intensität der AOM in Sedimenten mit verschiedenen Oberflächenbesiedlungen zeigte, dass bei einem höheren Methanfluss im Sediment auch die Rate der AOM höher war, als bei niedrigeren Methanflüssen. Die *in vitro* ermittelten Raten stimmten genau mit solchen überein, die mit radioaktiv markierten Substanzen ermittelt wurden. In tieferen Sedimentschichten und direkt in Gashydraten konnte keine AOM festgestellt werden.

**3** Die Rate der anaeroben Oxidation von Methan zeigte eine deutliche Abhängigkeit von der Temperatur. Die Proben vom Hydratrücken zeigten von 4 bis 12 °C die höchsten Sulfat-Reduktionsraten mit Methan als Elektronendonator; bei höheren Temperaturen sank die Aktivität. Mikrobielle Matten aus dem Schwarzen Meer zeigten dagegen ein mesophiles Temperaturprofil mit gleich hohen Raten zwischen 12 und 24 °C. Beide Proben zeigten gleich hohe Sulfat-Reduktionsraten bei 22‰ und 33‰ Salinität. Die Aktivität verringerte sich jedoch deutlich in Inkubationen bei 63‰ oder 14‰. Das pH-Optimum der Proben vom Hydratrücken lag bei 7,4; höhere oder niedrigere Werte führten zu verminderter Aktivität. Die mikrobiellen Matten waren dagegen im Bereich von pH 6,7 bis 8,1 unverändert aktiv. Einen sehr starken Effekt hatte die Erhöhung des Methanpartialdrucks

von 0,1 auf 1,1 MPa, die in den Proben aus dem Schwarzen Meer zu einer zweifachen und in denen vom Hydratrücken zu einer fünffachen Aktivitätssteigerung führte.

**4** Da es sich bei der AOM vermutlich um einen zweistufigen syntrophen Prozess mit einem Methan oxidierenden und einem Sulfat reduzierenden Organismus handelt, ist das Intermediat, das zwischen den beiden Organismen übertragen wird von besonderem Interesse. In dieser Arbeit wurden potentielle Intermediate ( $H_2$ , Acetat, Formiat oder Methanol) zu Inkubationen ohne Methan gegeben und die Sulfat-Reduktion in Kurzzeitexperimenten beobachtet. Wäre dabei eine signifikant höhere Rate aufgetreten als bei Inkubationen mit Methan als Elektronendonator, wäre dies ein Hinweis auf das in der Syntrophie verwendete Intermediat. Keine der Substanzen führte jedoch zu einem solchen Effekt. Der Prozess der anaeroben Methan-Oxidation ließ sich durch die Zugabe von BES unterdrücken. Da BES ein spezifischer Inhibitor gegen Methanogene ist, zeigt dies die enzymatische Ähnlichkeit der AOM mit der Methanogenese. In Inkubationen mit einem Inhibitor gegen Sulfatreduzierer (Molybdat) war in den Proben vom Hydratrücken keine Aktivität mehr festzustellen. In den Proben aus dem Schwarzen Meer dagegen reduzierte sich die Aktivität lediglich um zwei Drittel. Bei der Anwendung von Antibiotika, die nur gegen Bakterien, nicht aber gegen Archaeen wirken, war der Prozess in beiden Proben nicht beeinträchtigt.

**5** In aufeinanderfolgenden Inkubationen der Sedimente vom Hydratrücken konnte unter erhöhtem Methanpartialdruck (1,37 MPa) die von Methan abhängige Sulfat-Reduktion innerhalb von 20 Monaten um das 6,5fache auf  $0,23 \text{ mmol d}^{-1} \text{ g}_{\text{dw}}^{-1}$  gesteigert werden. Gleichzeitig nahm die Anzahl der Konsortien im Sediment von  $5 \times 10^7$  auf  $5,7 \times 10^8$  zu. Die abgeschätzte durchschnittliche Verdopplungszeit eines Konsortiums lag bei 4,7 Monaten. Konsortien können vermutlich auf verschiedene Weise entstehen: Zum einen scheinen sich große Konsortien zu teilen, indem Sulfat-Reduzierer von außen in den zentralen Bereich der Archaeen hineinwachsen. Auch lösen sich kleinere Konsortien oder Teile von Konsortien von größeren ab. Ferner wurde beobachtet, dass sehr große Konsortien platzen und viele Zellen sowohl von Sulfat-Reduzierern als auch von Archaeen freisetzen. Analysen der Biomarker und die phylogenetische Zuordnung der Konsortien durch Hybridisierung der 16S rRNA mit spezifischen Sonden bestätigten die große

Ähnlichkeit der angereicherten Konsortien mit den *in situ* vorkommenden. In den Proben aus dem Schwarzen Meer wurde in aufeinander folgenden Inkubationen derselben Probe bei erhöhtem Methanpartialdruck keine Steigerung der Aktivität festgestellt. Der Einbau von Kohlenstoff aus  $^{13}\text{C}$  markiertem Methan in die Biomasse zeigte jedoch, dass auch in diesen Proben eine Synthese von Biomasse aus Methan stattfand.

**6** Die Isolierung von Sulfat reduzierenden Bakterien und methanogenen Archaeen aus beiden Proben mit diversen Substraten (u.a. Lactat, Acetat,  $\text{H}_2/\text{CO}_2$ , Formiat, Methanol, Methylamine) ergab 44 Stämmen der Gattungen *Desulfobacter*, *Desulfobacula*, *Desulfofrigus* und *Methanococcoides*. Keines der Isolate war mit den ANME-Gruppen oder der *Desulfosarcina/Desulfococcus* Gruppe verwandt. Weder in Inkubationen der SRB noch in solchen der Methanogenen wurde Methan anaerob oxidiert. Auch in Co-Kulturversuchen konnte eine anaerobe Oxidation von Methan durch diese Isolate nicht festgestellt werden.

**7** Die Bestimmung des  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnisses im Methan während dessen anaerober Oxidation zeigte eine Zunahme des leichteren  $^{12}\text{C}$ -Kohlenstoffs. Da biologische Prozesse normalerweise dieses Isotop bevorzugen, müsste das verbleibende Methan isotopisch schwerer werden. Inkubationen ohne Methan zeigten eine geringe Produktion isotopisch sehr leichten Methans. Berechnungen ergaben, dass eine geringe Beimischung dieses leichten Methans zu den gemessenen Werten führen könnte. Der Fraktionierungs-Faktor der anaeroben Oxidation von Methan lässt sich demnach vermutlich nur mit hochgradig angereicherten anaerob Methan oxidierenden Organismen ermitteln, die keine Hintergrundaktivität von Methanogenese aufweisen, oder mit einer Reinkultur.

# Teil I: Mikrobiologische Studien zur anaeroben Oxidation von Methan (AOM)

## A Einleitung

Die anaerobe Oxidation von Methan (AOM) ist ein in marinen Habitaten weit verbreiteter, global relevanter Prozess. Mindestens 75 Tg ( $75 \times 10^{12}$  g) Methan werden pro Jahr in anoxischen marinen Sedimenten oxidiert; das ist fast doppelt soviel, wie weltweit pro Jahr aus marinen Systemen in die Atmosphäre gelangt (40 Tg; Hinrichs & Boetius, 2002). Der Prozess der AOM wurde vor mehr als 30 Jahren aufgrund von gegenläufigen Konzentrationsprofilen von Methan und Sulfat in marinen Sedimenten postuliert, da diese nur durch den gleichzeitigen Verbrauch beider Substanzen erklärbar sind (Abb. 1; Martens & Berner, 1974; Barnes & Goldberg, 1976; Reeburgh, 1976). Unterstützt wurde dies durch die Messung von Umsatzraten von radioaktiv markiertem Methan und Sulfat, sowie durch die gemessenen natürlichen  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnisse von Methan und  $\text{CO}_2$  (Reeburgh, 1980; Iversen & Blackburn, 1981; Oremland & Des Marais, 1983).

Die Oxidation von Methan mit molekularem Sauerstoff ist ein seit 1906 bekannter Prozess, für den nicht nur die verantwortlichen Organismen identifiziert und isoliert wurden, sondern über den auch Kenntnisse der physiologischen, genetischen und enzymatischen Details vorliegen (Söhngen, 1906; Hanson & Hanson, 1996; Merckx, *et al.*, 2001; Bowmann, 2003; Lidstrom, 2003). Für die anaerobe Oxidation von Methan gibt es diese umfassenden Kenntnisse noch nicht, obwohl in den letzten Jahren viele Informationen hinzu gewonnen wurden. So konnten die wahrscheinlich für die AOM verantwortlichen Mikroorganismen durch 16S rRNA Genanalysen in Sedimenten mit AOM phylogenetisch eingeordnet werden (Boetius *et al.*, 2000; Orphan *et al.*, 2001). Auch die für diese Organismen spezifischen Biomarker wurden in Habitaten mit AOM in hohen Konzentrationen gefunden. Ihr sehr niedriges  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnis, ist nur durch eine Assimilation von Kohlenstoff aus dem isotopisch meist leichten Methan zu erklären (Elvert *et al.*, 1999; Hinrichs *et al.*, 1999; Thiel *et al.*, 1999; 2001; Pancost *et al.*, 2000). Kulturen dieser Organismen liegen bisher jedoch nicht vor.

In der hier vorgelegten Arbeit gelang es erstmals, den Prozess der AOM unter Laborbedingungen zu etablieren. Dies ermöglichte Versuche zur Aufklärung der grundlegenden Physiologie und des Einflusses chemischer und physikalischer Faktoren im umgebenden Wasser auf die AOM. Ferner ist es zum ersten Mal gelungen, Wachstum von anaerob Methan oxidierenden Konsortien aus Archaeen und Deltaproteobakterien von einem Standort mit AOM in Inkubationen unter erhöhtem Methanpartialdruck zu erzielen.

## **1. Ursprung und Kreislauf von Methan auf der Erde**

Methan ( $\text{CH}_4$ ) ist der einfachste Kohlenwasserstoff und damit auch die einfachste organische Verbindung. Die vier Wasserstoffatome umgeben das  $\text{sp}^3$ -hybridisierte Kohlenstoffatom tetraedrisch. Aufgrund dieses Aufbaus und der apolaren C–H Bindungen ist Methan sehr stabil und reaktionsträge. Methan ist farb- und geruchlos und aufgrund seines niedrigen Siedepunktes ( $-161,5\text{ °C}$ ) bei Raumtemperatur gasförmig. Neben einigen anderen kurzkettigen aliphatischen Kohlenwasserstoffen (Ethan, Propan, Butan u.a.) ist Methan mit mindestens 75% der Hauptbestandteil von Erdgas. In der frühen Erdgeschichte (vor etwa 2,7 Millionen Jahren) war Methan vermutlich auch ein wesentlicher Bestandteil der Atmosphäre (Chang *et al.*, 1983). Mit der Zunahme der Sauerstoffkonzentration infolge der Photosynthese nahm der Methangehalt jedoch stark ab. In den letzten 3000 Jahren betrug die Methankonzentration in der Atmosphäre nur etwa 0,8 ppmv, bevor sie seit 250 bis 300 Jahren kontinuierlich um ca. 1% pro Jahr auf den heutigen Wert von etwa 1,7 ppmv anstieg (Cicerone & Oremland, 1988; Crutzen, 1991). Dies wird hauptsächlich auf menschlichen Einfluss zurückgeführt, unter anderem auf Methanemissionen aus der Industrie, der Viehhaltung und vor allem aus dem Reisanbau (Ehalt, 1974; Hogan *et al.*, 1991; Breás *et al.*; Reeburgh, 1996; 2001). Dieser kontinuierliche Anstieg scheint sich aber langsam wieder zu verringern (Hogan *et al.*, 1991; Steele *et al.*, 1992; Simpson *et al.*, 2002).

Da Methan die von der Erdoberfläche zurückstrahlende Infrarotstrahlung absorbiert und so zur globalen Erwärmung der Atmosphäre beiträgt, sind Kenntnisse über deren Methangehalt für die Klimawissenschaft äußerst wichtig (Cicerone & Oremland, 1988).

Aufgrund seiner Absorptionscharakteristik ist Methan ein 26 mal effektiveres Treibhausgas als CO<sub>2</sub> (Lieleveld *et al.*, 1993).

Methan kommt in großen Lagerstätten als freies Gas oder, bei hohem Druck und niedriger Temperatur, als Clathrat-Hydrat vor (Kvenvolden, 1993; Crabtree, 1995; Buffet, 2000). Methan-Hydrate sind kristalline Strukturen, in denen durch Wasserstoffbrücken verbundene Wassermoleküle Käfigstrukturen bilden, worin Gasmoleküle bestimmter Größe (z.B. Methan oder auch CO<sub>2</sub>) eingeschlossen sind (Crabtree, 1995; Buffet, 2000). Gashydrate sind nur in einem begrenzten Stabilitätsbereich von niedrigen Temperaturen (<15 °C) und hohem Druck (>50 bar) vorzufinden. Solche Bedingungen können beispielsweise in der Tiefsee und in Permafrostböden vorliegen (Kvenvolden, 1993; Crabtree, 1995). Die Ausbreitung und Größe dieser Lagerstätten zu kennen, ist sowohl vom klimatischen als auch vom ökonomischen und technologischen Standpunkt aus bedeutsam. Ob es technisch möglich sein wird, Methan aus Gashydraten als nutzbare Energieressource zu bergen, ist allerdings noch unklar (Kvenvolden, 1999). Methanaustritte aus Gashydratlagerstätten sind ein viel beobachtetes Phänomen (Suess *et al.*, 1999; Torres *et al.*, 2002; Tryon *et al.*, 2002). Es ist jedoch schwer zu ermitteln, wie groß die Menge des freigesetzten Methans ist und inwieweit diese bei einer globalen Erwärmung ansteigt (Cicerone & Oremland, 1988; Kvenvolden, 1999). Die Dissoziation von Gashydraten kann auch zur Destabilisierung des Meeresbodens, insbesondere an Kontinentelhängen führen. Dadurch ausgelöste Hangrutschungen können Tsunamis verursachen. Auch „offshore“-Anlagen sind durch destabilisierte Sedimente gefährdet (Kelley *et al.*, 1994; Kvenvolden, 1999).

Zur Zeit werden jährlich schätzungsweise 1200 Tg Methan auf der Erde produziert (Reeburgh *et al.*, 1993; Reeburgh, 1996). Mehr als 60% davon gelangen nicht in die Atmosphäre, sondern werden vorher von Mikroorganismen oxidiert (Reeburgh, 1996). In der Atmosphäre werden wiederum 90% des Methans durch Hydroxylradikale ( $\cdot\text{OH}$ ) chemisch oxidiert (Ehalt, 1974; Cicerone & Oremland, 1988; Lieleveld *et al.*, 1993). Wo Methan und Sauerstoff vorkommen, etwa an den Sediment-Wasser-Grenzschichten in limnischen und marinen Habitaten, wird Methan von aeroben methanotrophen Bakterien oxidiert. An Boden-Luft-Grenzschichten oxidieren diese Bakterien auch atmosphärisches Methan und stellen somit eine Methansenke dar (Whalen & Reeburgh, 1990; King, 1992). Die vor etwa 30 Jahren zum ersten Mal postulierte anaerobe Oxidation von Methan ist

anscheinend an die Reduktion von Sulfat gekoppelt und tritt daher hauptsächlich an marinen Standorten auf. Aber auch an limnischen Standorten und in Sodaseen wurde eine anaerobe Oxidation von Methan festgestellt (Panganiban *et al.*, 1979; Iversen *et al.*, 1987).

## 2. Die Bildung von Methan

Nur ein geringer Teil des weltweit vorkommenden Methans entsteht aus Kohlenstoffquellen nicht biologischer Herkunft, als Folge geothermischer (thermogener) Prozesse (Wellsbury & Parkes, 2000; Sorokin *et al.*, 2001). Vorwiegend wird Methan aus organischem Material biologischen Ursprungs gebildet, und zwar zu etwa 20% durch geochemische und zu 80% durch mikrobielle Prozesse (Schoell *et al.*, 1988; Bréas *et al.*, 2001). Die dafür verantwortlichen Mikroorganismen gehören zu den Archaea (Woese & Fox, 1977) und werden als methanogene Mikroorganismen oder Methanogene bezeichnet. Sie sind die einzige bekannte Organismengruppe, die Methan als Endprodukt ihres Energiestoffwechsels produziert (Balch *et al.*, 1979).

Typische Habitate für Methanogene sind Sumpfbereiche, Reisfelder und die Mägen von Wiederkäuern; hier werden mehr als 70% des mikrobiologisch produzierten Methans gebildet (Ehalt, 1974; Reeburgh, 1996, Bréas *et al.*, 2001). Auch in Termitendärmen und Kläranlagen kommen Methanogene vor und tragen zur Methanemission bei. Ein geringerer Anteil von Methan wird mikrobiologisch in Mülldeponien produziert und entsteht durch die Verbrennung von Biomasse. Neben diesen Quellen der rezenten Methanbildung wird zusätzlich in Kohleminen und durch Erdgasaustritte eingelagertes Methan freigesetzt (Reeburgh, 1996).

Aufschluss über die Entstehung des Methans kann das Verhältnis der stabilen Isotope des Kohlenstoffs  $^{12}\text{C}$  und  $^{13}\text{C}$  geben, welches als  $\delta^{13}\text{C}$ -Wert im Vergleich zu dem Pee Dee Belemnite-Standard angegeben wird. Mikrobiologische Prozesse diskriminieren aufgrund des kinetischen Isotopeneffekts gegen das schwerere Isotop. Die daraus resultierende Anreicherung an  $^{12}\text{C}$  führt zu sehr negativen  $\delta^{13}\text{C}$ -Werten (-110‰ bis -50‰). Thermogen entstandenes Methan liegt dagegen bei -50‰ bis -20‰ (Whiticar, 1999). Die Bestimmung des Anteils von Deuterium im Wasserstoff des Methans ( $\delta\text{D}$ -Wert) kann weiteren Aufschluss über den Entstehungsprozess (Methanogenese aus Acetat oder

aus  $H_2/CO_2$ ) des Methans geben (Whiticar *et al.*, 1986). Anhand des Anteils des instabilen  $^{14}C$ -Isotops lässt sich auch das Alter des Methans bestimmen (Cicerone & Oremland, 1988).

### **3. Methan in marinen Habitaten**

Sowohl dissozierende Gashydrate (Reeburgh *et al.*, 1993) als auch heiße und kalte methanhaltige Fluidaustritte in geothermisch aktiven Bereichen wie Subduktionszonen und Bruchzonen der Erdrinde (hot vents, cold seeps) sowie Sedimentkompaktionen an passiven Kontinentalrändern stellen in marinen Habitaten Methanquellen dar (Schmaljohann, 1993; Linke *et al.*, 1994). Die Menge des in Gashydraten festgelegten Kohlenstoffs übersteigt Schätzungen zu Folge alle anderen weltweiten Vorkommen an fossilem organischen Kohlenstoff (Kvenvolden, 1988; MacDonald, 1990).

Seit der Bestimmungen der  $\delta^{13}C$ -Werte von Methan in Gashydraten ist bekannt, dass dieses Methan meist mikrobiellen Ursprungs ist, und dass die mikrobielle Methanogenese in marinen Sedimenten eine weitaus größere Rolle spielt als bisher angenommen (Kvenvolden, 1995). Methanogene leben in der gleichen ökologischen Nische wie Sulfat reduzierende Bakterien (SRB). Als letztes Glied im anaeroben Abbau von organischem Material verwerten Methanogene sowohl einfache organische Kohlenstoffverbindungen als auch molekularen Wasserstoff und  $CO_2$ . Da die Sulfat-Reduktion energetisch günstiger ist, setzen sich die SRB in der Regel gegenüber den methanogenen Organismen durch. In tieferen Sedimentschichten allerdings, in denen die Sulfatkonzentration geringer als 3 mM ist, findet hauptsächlich Methanogenese statt (Capone & Kiene, 1988). Ferner gibt es sogenannte nicht kompetitive Substrate (Methylamine, Methanol, Dimethylsulfid), die von Methanogenen, wahrscheinlich jedoch nicht von SRB verwendet werden. Somit können beide Prozesse – Methanogenese und Sulfat-Reduktion – auch gleichzeitig auftreten (Cicerone & Oremland, 1988). Eine geringe Menge Methan wird in marinen Systemen auch innerhalb der oxischen Wassersäule in anoxischen Mikronischen gebildet, wie sie herabsinkende Detrituspartikel und der Darm von Tieren bieten. Obwohl marine Systeme bis zu 65 Tg Methan pro Jahr produzieren (Ehalt, 1974; Reeburgh *et al.* 1993) gelangen nur höchstens 15% davon in die Atmosphäre (Ehalt, 1974; Reeburgh, 1996; Hinrichs &



Boetius, 2002). Der Großteil wird vorher oxidiert, mindestens 80% bereits in den anoxischen Sedimentschichten. Dies entspricht einer Umsetzung von 5 – 20% des gesamten atmosphärischen Methanflusses durch AOM (Martens & Berner, 1974; Barnes & Goldberg, 1976; Reeburgh, 1976, 1996; Hinrichs & Boetius, 2002). Innerhalb des globalen Methankreislaufs nimmt die anaerobe Oxidation von Methan somit eine zentrale Rolle ein. Sie ist vermutlich von der Methankonzentration und der Verfügbarkeit von Sulfat abhängig. Wie bereits erwähnt ist auch die Methanogenese von der Sulfatkonzentration beeinflusst, stärker aber von der Verfügbarkeit von organischem Material (Cicerone & Oremland, 1988). Beide mikrobiologischen Prozesse bestimmen das dynamische Gleichgewicht zwischen der Dissoziation und der Bildung von Gashydraten, deren Stabilität wiederum von den jeweiligen Temperatur- und Druckverhältnissen abhängt. Dickens (2001; 2003) beschreibt diese Zusammenhänge in einem komplexen Modell, in dem Gashydrate als mikrobiell vermittelte Kondensatoren (Puffer) des Methanhaushaltes fungieren.

#### **4. Die mikrobiologische Oxidation von Methan**

##### **4.1. Die aerobe Oxidation von Methan**

Aerob Methan oxidierende Mikroorganismen gehören phylogenetisch zu den Bacteria. Sie bilden eine physiologische Untergruppe der methylotrophen Bakterien, die neben Methan auch andere C<sub>1</sub>-Verbindungen oxidieren können. In der Umwelt sind sie an Standorten anzutreffen, an denen Methan und molekularer Sauerstoff vorhanden sind. Sie kommen in Böden, auf der Oberfläche von Pflanzen und in Symbiosen mit Tieren vor, zum Beispiel in den Kiemen mariner Muscheln (Cavanaugh, 1987; Hanson *et al.*, 1993). In limnischen Habitaten oxidieren sie meist das gesamte Methan, das im anoxischen Bereich durch Methanogenese gebildet wird (Rudd & Taylor, 1980). In marinen Habitaten kommen sie in der oxischen Wassersäule und an der Sediment-Wasser-Grenzschicht vor, spielen global aber wahrscheinlich eine untergeordnete Rolle bei der Umsetzung von Methan (Rudd & Taylor, 1980; King, 1992; Reeburgh *et al.*, 1993). Über marine, psychrophile und eventuell barophile oder barotolerante aerobe Methan-Oxidierer ist bisher allerdings auch erst wenig bekannt.

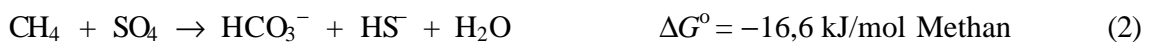
Phylogenetisch werden die methanotrophen Bakterien in die Typen I und II unterteilt. Typ I ist identisch mit der Familie der Methylococcaceae und umfasst die Gattungen *Methylosphaera*, *Methylobacter*, *Methylomicrobium* und *Methylomonas*. Eine Untergruppe vom Typ I sind die thermophilen Gattungen *Methylosinus* und *Methylocystis*, welche als Typ X bezeichnet werden. Typ I mit Typ X gehören zu den Gammaproteobakterien. Methanotrophe vom Typ II dagegen gehören zu den Alphaproteobakterien und beinhalten die Gattungen *Methylococcus* und *Methylocaldum* der Familie Methylocystaceae (Bowmann, 2003). Auch in anderen Merkmalen als den 16S rRNA Gensequenzen unterscheiden sich Typ I und II: Zur Kohlenstoffassimilation nutzen die Organismen vom Typ I (einschließlich Typ X) den Ribulosemonophosphat-Weg (RuMP). Sie bilden Dauerstadien (Cysten) ähnlich wie bei *Azotobacter* und besitzen Fettsäuren mit in der Mehrheit 16 C-Atomen. Die Typ II Methanotrophen dagegen verwenden den Serin-Weg zur Assimilation von Zellkohlenstoff. Sie bilden Exosporen oder lipide Cysten und besitzen länger-kettige Fettsäuren (Bowman, 2003).

Bei aeroben methanotrophen Bakterien wurde die Biochemie der Methanoxidation vollständig aufgeklärt: Im ersten Schritt wird das Methan mittels einer Monooxygenase zu Methanol oxidiert. Alle methanotrophen Organismen enthalten eine partikuläre, kupferhaltige Monooxygenase (pMMO). Einige besitzen zusätzlich die Fähigkeit, bei Kupfermangel ein lösliches Enzym zu synthetisieren (sMMO) (Merkx *et al.*, 2001). Methanol wird anschließend durch Dehydrogenasen über die Oxidationsstufen von Formaldehyd und Formiat weiter zu CO<sub>2</sub> umgesetzt (Lidstrom, 2003). Zum Aufbau von Biomasse wird Formaldehyd in den RuMP- oder den Serin-Weg überführt (Anthony, 1986). Mit Sauerstoff als Elektronenakzeptor ist die Oxidation von Methan ein Prozess, der viel Energie für das Wachstum eines Organismus liefert. Aerob methanotrophe Organismen wachsen unter Laborbedingungen innerhalb von 1–4 Tagen (Whittenbury *et al.*, 1970; Hazeu 1975; Dianou & Adachi, 1999).

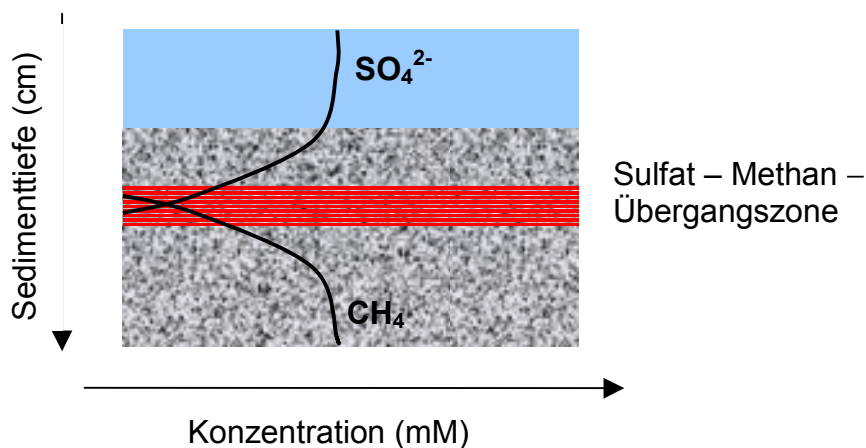


## 4.2. Die anaerobe Oxidation von Methan (AOM)

Die Entdeckung der anaeroben Oxidation von Methan schließt eine wichtige Lücke in der Erforschung des marinen und globalen Methan- und Kohlenstoffkreislaufs, da sie quantitativ eine ähnliche Bedeutung wie die aerobe Oxidation hat. Auch für unsere Vorstellung von der Entwicklung der Atmosphäre und der Stoffwechselwege auf der Erde hat die Untersuchung der anaeroben Oxidation von Methan neue Aspekte geliefert (Hayes *et al.*, 1993; Valentine & Reeburgh, 2000; Hinrichs & Boetius, 2002; Hinrichs *et al.*, 2003). Erste Hinweise auf die Möglichkeit der Oxidation von Methan in sauerstofffreien Habitaten gab es durch gegenläufige Konzentrationsprofile von Sulfat und Methan in marinen Sedimenten, die nur durch den gleichzeitigen Verbrauch beider Verbindungen erklärbar waren (Abb. 1; Martens & Berner, 1974; Barnes & Goldberg, 1976; Reeburgh, 1976). Zweifel an dieser Erklärung entstanden als im Laborexperiment unter anoxischen Bedingungen keine Oxidation von Methan beobachtet wurde (Martens & Berner, 1974). Messungen mit radioaktiv markierten Substanzen ( $^{14}\text{C}$ -Methan und  $^{35}\text{S}$ -Sulfat) unterstützten jedoch die These eines anaeroben Abbaus von Methan, da sich das Maximum der Rate der Methan-Oxidation in der gleichen Sedimenttiefe wie das der Sulfat-Reduktion befand (Iversen & Blackburn, 1981). Ferner war das  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnis im Methan in anoxischen Sedimenten im Vergleich zur Wassersäule oder oxischen Sedimentschichten zugunsten des schweren Isotops, im  $\text{CO}_2$  dagegen zugunsten des leichten  $^{12}\text{C}$ -Kohlenstoffs verschoben. Dies war ein weiterer Hinweis auf eine anaerobe Oxidation von isotopisch leichtem Methan zu  $\text{CO}_2$  (Reeburgh, 1980; Oremland & Des Marais, 1983; Alperin *et al.*, 1988)



Mittlerweile wurde die anaerobe Oxidation von Methan an vielen Standorten nachgewiesen. Je höher der Methanfluss ist, desto höher ist meist auch die Aktivität des Prozesses (Hinrichs & Boetius, 2002). An Stellen, wo viel Methan aus Gasreservoirs, durch hohe Methanogenese Aktivität oder aus Hydraten ausströmt, wie zum Beispiel am Hydratrücken (Boetius *et al.*, 2000), im Golf von Mexiko (Aharon & Fu, 2000) oder auch in der Eckernförder Bucht (Bussmann *et al.*, 1999), sind die Aktivitäten der AOM sehr



**Abb. 1** Schematisch dargestellte gegenläufige Konzentrationsgradienten von Sulfat ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) und Methan ( $\text{CH}_4$ ) im Sediment. Die Konzentration von Sulfat aus dem Meerwasser (28 mM) nimmt mit zunehmender Sedimenttiefe ab. Die absolute Konzentration von Methan kann sehr unterschiedliche sein, da es aus tieferen Sedimentschichten kommt nimmt die Konzentration nach oben hin ab. In rot markiert ist die Methan – Sulfat – Übergangszone, in der eine anaerobe Oxidation von Methan gekoppelt an eine Reduktion von Sulfat stattfinden könnte.

hoch. Die Zone, in der die AOM stattfindet, ist aber häufig nur wenige Millimeter breit, was zur Ausbildung steiler Gradienten von Methan und Sulfat führt. Niedrigere Aktivitäten findet man an weniger intensiven Methanaustrittsstellen wie zum Beispiel vor Namibia (Niewöhner *et al.*, 1998) oder im Kattegat (Iversen & Jørgensen, 1985). Auch in der tiefen Biosphäre kann es zu Methan-Sulfat-Übergangszonen kommen, in denen Methan anaerob oxidiert wird (Burns *et al.*, 1998).

## 5. An AOM beteiligte Mikroorganismen

Den Prozess der anaeroben Oxidation von Methan unter Laborbedingungen zu etablieren, ist, wie bereits erwähnt, bisher nicht gelungen (Martens & Berner, 1974). Auch bei bekannten Organismen, z.B. bei Methanogenen, konnte eine anaerobe Methan-Oxidation nicht festgestellt werden. Sie können zwar während der Methanogenese einen kleinen Anteil des Methans wieder zu  $\text{CO}_2$  oxidieren, sind aber nicht zu einem Nettoumsatz von Methan in der Lage (Zehnder *et al.*, 1979; Harder, 1997; Valentine, 2000). Auch von Sulfat reduzierenden Bakterien wurde zuvor berichtet, dass diese kleine Mengen von Methan cometabolisch während der Oxidation anderer organischer Substrate umsetzen (Davies &

Yarborough, 1966). Diese Beobachtungen wurden jedoch nie bestätigt. Zehnder & Brock (1980) formulierten als erste die Vermutung, dass es sich bei der anaeroben Oxidation von Methan um einen zweistufigen Prozess handeln könnte. Methan wird demnach im ersten Schritt von methanogenen Archaeen zu Methanol oder Acetat umgesetzt (reverse Methanogenese), welches in einem zweiten Schritt von einem Sulfat oder Mangan(IV) reduzierenden Bakterium weiter oxidiert wird.

Zweistufige, syntrophe Abbauprozesse unter anoxischen Bedingungen sind für eine Reihe von Substraten wie z.B. Propionat, Butyrat oder Ethanol bekannt (Schink, 1997). Syntrophie ist eine spezielle Form von Symbiose, in der stoffwechselphysiologisch unterschiedliche Organismen voneinander abhängen, um ein Substrat abzubauen, das keiner der Organismen alleine umsetzen kann (Schink, 1997).

Hoehler *et al.* (1994) postulierten für die AOM eine solche Syntrophie mit Wasserstoff als Intermediat (Abb. 2). Methanogene können jedoch auch bei niedrigem Wasserstoffpartialdruck keinen Wasserstoff produzieren (Valentine *et al.*, 2000). Der Einsatz von Molybdat und Bromoethansulfonat (BES) als spezifische Inhibitoren für Sulfat reduzierende Bakterien bzw. methanogene Archaeen (Oremland & Capone, 1988), führte hinsichtlich der Frage, ob es sich um eine Syntrophie zwischen diesen beiden Organismengruppen handelt, zu widersprüchlichen Ergebnissen. In keiner Untersuchung konnte bisher eine anaerobe Oxidation von Methan durch Molybdat vollständig gehemmt werden (Alperin & Reeburgh, 1985; Iversen *et al.*, 1987; Hansen *et al.*, 1998). Die Zugabe von BES dagegen führte entweder zu einer kompletten oder einer teilweisen Hemmung der AOM (Zehnder *et al.*, 1979; Alperin & Reeburgh, 1985; Hoehler *et al.*, 1994).

Die Hypothese, dass die anaerobe Oxidation von Methan mit Sulfat als Elektronenakzeptor von einem „Konsortium“ katalysiert wird, wurde hingegen durch molekulare Untersuchungen bestätigt. Hohe Konzentrationen von Biomarkern, die spezifisch für SRB (z.B. spezielle C<sub>15</sub>-, C<sub>16</sub>-, C<sub>17</sub>- und andere Fettsäuren, mono- und di-Alkylglyzerolether) und methanogene Archaea (z.B. Archaeol, Hydroxyarchaeol, Crocetan, Pentamethylcosan [PMI], Biphytandiole) sind, wurden zusammen an Standorten mit anaerober Methan-Oxidation gefunden. Der geringe <sup>13</sup>C-Gehalt dieser Biomarker weist auf ihre Synthese aus dem isotopisch meist leichtem Methan hin (Elvert *et al.*, 1999; 2003; Hinrichs *et al.*, 1999; Thiel *et al.*, 1999, 2001; Pancost *et al.*, 2000).

Sequenzierungen von archaeellen 16S rRNA Genen aus Sedimentproben von Standorten mit sehr aktiver AOM zeigten eine Vielzahl von Sequenzen, die in Gruppen zusammen gehören (ANME-1 und ANME-2; Bezeichnung nach ANaerobem MEthan-Oxidierer). In diesen Sequenzgruppen sind keine Sequenzen bisher kultivierter Organismen enthalten. Die nächsten kultivierten Verwandten von ANME-1 und -2 gehören zu den Methanosarcinales (Hinrichs *et al.*, 1999). Durch *in situ* Hybridisierung von 16S rRNA mit Sonden für Sequenzabschnitte der ANME-2 Gruppe konnten Boetius *et al.* (2000) in Sedimenten des Hydratrückens Aggregate aus diesen Zellen und Zellen von SRB der Gruppe *Desulfosarcina/Desulfococcus* mikroskopisch darstellen. Mittlerweile wurden an unterschiedlichen Standorten mit AOM Konsortien mit zum Teil anderen Formen, anderen archaeellen und Sulfat reduzierenden Partnern, sowie nur aus Archaeen bestehende Aggregate gefunden (Lösekann, 2002; Orphan *et al.*, 2002). Orphan *et al.* (2001, 2002) zeigten durch *in situ* Hybridisierung von 16S rRNA kombiniert mit sekundärer Ionen-Massenspektrometrie, dass die mit spezifischen Sonden für die ANME-2 Gruppe anfärbaren Zellen auch einen niedrigen <sup>13</sup>C-Gehalt aufweisen. Dies zeigt, dass diese Zellen ihre Biomasse aus leichtem Methankohlenstoff aufgebaut haben.

## **6. Thermodynamik der anaeroben Oxidation von Methan über Syntrophie in einem Konsortium**

Es wird davon ausgegangen, dass es sich bei der AOM um einen zweistufigen Prozess in einer Syntrophie zwischen einem Archaeon, das in „reverser Methanogenese“ Methan oxidiert, und einem Sulfat-Reduzierer handelt (Zehnder & Brock, 1980; Hoehler *et al.*, 1994). Die prinzipielle Umkehrbarkeit eines katabolischen Prozesses wurde bereits für einen homoacetogenen Organismus beschrieben, der bei niedrigen Wasserstoffkonzentrationen Acetat zu CO<sub>2</sub> und Wasserstoff oxidiert (Zinder & Koch, 1984; Lee & Zinder, 1988). Bisher gelang es allerdings nicht, methanogene Organismen zu einer Umkehrung ihres Stoffwechsels zu veranlassen. Da jedoch während der Methanogenese ein Teil des gebildeten Methans nach dem Prinzip der Mikroreversibilität wieder oxidiert werden kann (Zehnder *et al.*, 1979; Harder, 1997a), scheint auch eine Nettoumkehr des Prozesses grundsätzlich möglich. Kürzlich wurde in Proben mit AOM Proteine mit großer Ähnlichkeit zu den Untereinheiten der Methyl-Coenzym-M-Reduktase nachgewiesen, dem Enzym,

welches den letzten Schritt der Methanogenese katalysiert, sowie der für Methanogene typische Cofaktor F<sub>430</sub> (Krüger *et al.*, 2003). Auch Gensequenzen für eine Untereinheit der Methyl-Coenzym-M-Reduktase (*mcrA*) wurden aus Proben mit AOM gewonnen; die Gene stammen anscheinend aus Organismen der ANME-Gruppe (Hallam *et al.*, 2003). Diese Ergebnisse unterstützen die These der „reversen Methanogenese“.

Die berechnete Energieausbeute der anaeroben Oxidation von Methan mit Sulfat beträgt bei Standardbedingungen ca. -17 kJ/mol. In der Natur herrschen allerdings niemals Standardbedingungen, außerdem ändert sich dieser Wert je nach der Konzentrationen der Edukte und Produkte (Gleichung 3).

$$\Delta G = \Delta G^{\circ}_T + RT \ln \frac{[\text{HCO}_3^-] [\text{HS}^-] [\text{H}_2\text{O}]}{[\text{CH}_4] [\text{SO}_4^{2-}]} \quad (3)$$

Nimmt man also an, dass es sich bei der AOM um einen zweistufigen Prozess handelt, so ist das Produkt der ersten Reaktion (Methan-Oxidation; verallgemeinernde Halbreaktion in Gleichung [4]) zugleich das Substrat für den zweiten Schritt (Sulfat-Reduktion; verallgemeinernde Halbreaktion in Gleichung [5]). Der Sulfat reduzierende Partner hält die Konzentration des noch unbekanntes Intermediates niedrig, verbessert so die Energieausbeute des ersten Schritts und macht diesen überhaupt erst möglich.



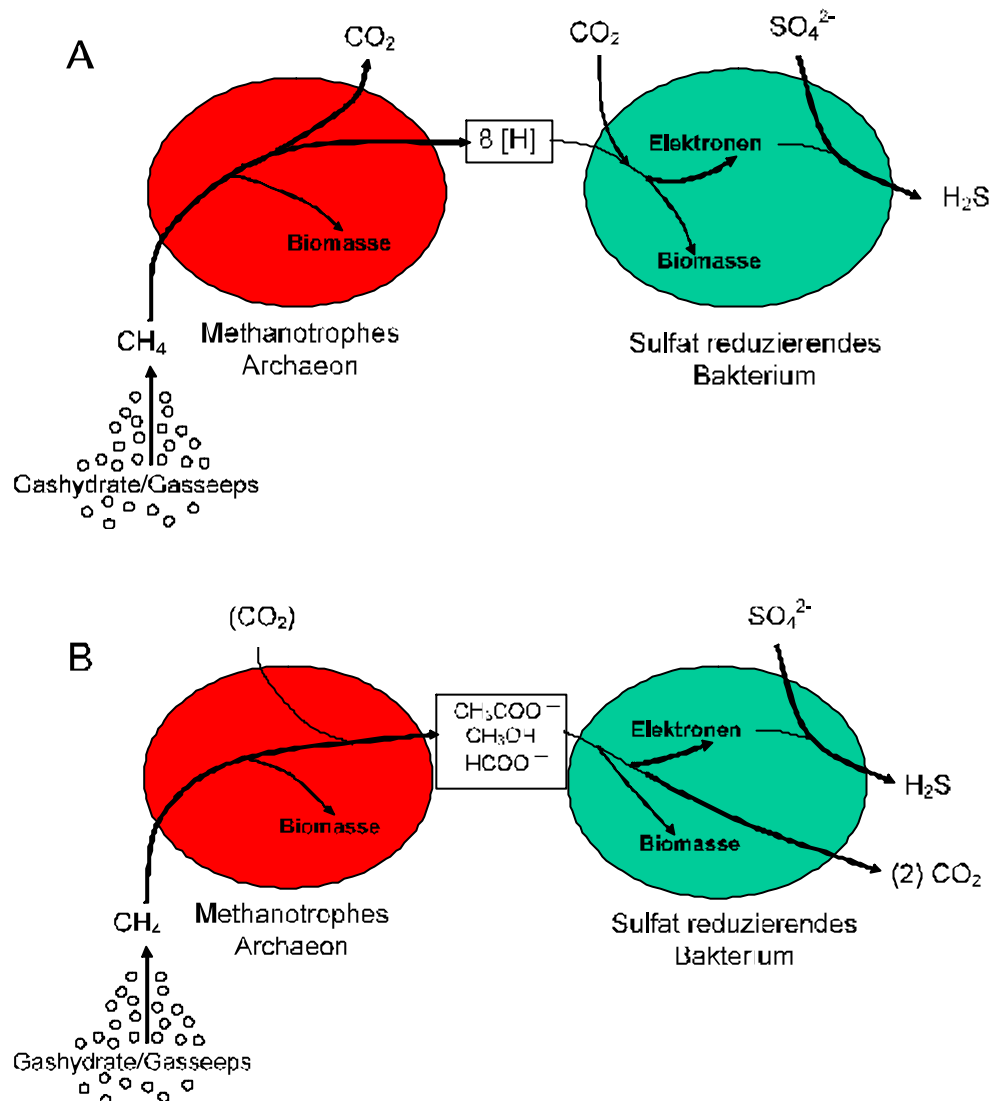
Für die Synthese von einem mol ATP werden etwa 50 kJ benötigt. Da jeder Prozess nur dann Triebkraft besitzt, wenn freie Energie als Entropie verloren geht, schlägt Schink (1997) vor, von 70 kJ/mol ATP auszugehen. Dieser Wert gilt für Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase bei einem ATP : ADP-Verhältnis von 10:1. Bei Substratmangel kann sich dieses Verhältnis zu Gunsten von ADP verschieben und dadurch den Energiebedarf zur ATP-Bildung auf schätzungsweise 6 kJ/mol ATP senken (Schink, 1997). ATP-Bildung ist an den Rückfluss „energiereicher“ Kationen über die ATP-Synthase (ATPase) gekoppelt, welche in der Zellmembran lokalisiert ist (Mitchell, 1961; Harold, 1986; Stock

*et al.*, 1999). Meist werden drei Protonen pro Molekül ATP benötigt; es werden aber auch Fälle mit 4 oder 5 Protonen pro ATP-Molekül vermutet (Schink, 1997; Stock *et al.*, 1999). Nimmt man somit an, dass eine katabole Reaktion mindestens ein Proton über die Zellmembran nach außen befördern muss, so sollte eine Reaktion mindestens ein Drittel der Energie liefern, wie sie für ein mol ATP benötigt wird (–15 bis –20 kJ/mol), um den Stoffwechsel einer Zelle zu erhalten (Schink, 1997).

In einer syntrophen Beziehung zwischen zwei Partnern muss der Gesamtprozess demnach –30 bis –40 kJ pro mol umgesetztes Substrat liefern. Berechnungen für die *in situ* Bedingungen am Hydratrücken ergeben für die anaerobe Oxidation von Methan mit Sulfat –40 kJ/mol, also eine Energiemenge die für ein Methan oxidierendes Konsortium ausreichen würde. Die Organismen befinden sich damit wahrscheinlich an der thermodynamischen Grenze für eine mögliche Energiekonservierung. Jackson & McInerney (2002) zeigten zwar, dass anaerobe Organismen sogar am thermodynamischen Gleichgewicht katalytisch aktiv sein können, doch bleibt fraglich, ob Substratumsatz unter diesen Bedingungen noch an ATP-Synthese gekoppelt ist.

In vielen beschriebenen syntrophen Kooperationen ist Wasserstoff das Intermediat, und es wurde der Begriff des „interspecies hydrogen transfer“ etabliert (Schink, 1997). Sulfat reduzierende Bakterien können die Wasserstoffkonzentration in einem Habitat sehr niedrig halten ( $0,5 \times 10^{-4}$  bis  $1 \times 10^{-4}$  atm) und so den ersten Schritt eines syntrophen Prozesses energetisch begünstigen oder sogar erst ermöglichen (Cord-Ruwisch, 1988; Boone *et al.*, 1989). Auch für die AOM wurde dementsprechend eine syntrophe Kooperation zwischen zwei Partnern mit molekularem Wasserstoff als Intermediat vorgeschlagen (Abb. 2) (Hoehler *et al.*, 1994). Versuche von Valentine *et al.* (2000) sprechen allerdings dagegen, da selbst bei niedrigen Wasserstoffkonzentrationen keine Wasserstoffproduktion bei Methanogenen festgestellt werden konnte. Auch thermodynamische Überlegungen sprechen gegen Wasserstoff als Intermediat (Sørensen *et al.*, 2001). Bei den sehr niedrigen Konzentrationen der Intermediate wäre der Energieverlust während der Diffusion zwischen den beiden Organismen zu groß und würde eine Energiekonservierung verhindern. Um diesen Energieverlust zu minimieren, müsste der Abstand zwischen den beiden Zellen geringer sein als die Dicke zweier Zellmembranen.





**Abb. 2** Schematische Darstellung eines Methan oxidierenden Konsortiums (A) nur mit Reduktionsäquivalenten (z.B.  $\text{H}_2$ ) als Intermediat. In diesem Fall würde keine Kohlenstoffverbindung übertragen, die dennoch festgestellten niedrigen  $^{13}\text{C}$ -Werte, resultieren vermutlich aus der Fixierung von isotopisch leichtem  $\text{CO}_2$ , das von dem methanotrophen Organismus produziert wird. (B) Mit einer Kohlenstoffverbindung (Acetat, Methanol oder Formiat) als Intermediat würde der isotopisch leichte Kohlenstoff über das Intermediat auf den Sulfat reduzierenden Partner übertragen, welcher hier auch das isotopisch leichte  $\text{CO}_2$  produzieren würde.

Das von Valentine & Reeburgh (2000) vorgeschlagene, auch in anderen syntrophen Kulturen als Intermediat dienende Actetat (Schink, 1997), kommt auf Basis dieser Überlegungen ebenfalls nicht in Betracht; gleiches gilt auch für Methanol (Sørensen *et al.*, 2001). Allein Formiat scheint ein mögliches Intermediat zu sein, da es als Substrat für einige Methanogene bekannt ist und bereits in syntrophen Kulturen als Intermediat beschrieben wurde (Schink, 1997). Doch auch für Formiat gibt es bisher keine positiven Ergebnisse aus Laborversuchen (Nauhaus *et al.*, 2002). Eine weitere Möglichkeit wäre ein Elektronenüberträger mit einem Redoxpotential, das zwischen denen der beiden Teilreaktionen liegt, so dass er zwischen beiden Partnern als Elektronenshuttle fungieren kann. Für Eisen reduzierende Organismen wurde beschrieben, dass sie redoxaktive Huminstofffraktionen nutzen, um Elektronen auf unlösliche Eisenoxide zu übertragen (Myers & Myers, 1992; Seeliger *et al.*, 1998).

Des Weiteren besteht die Möglichkeit, dass es sich doch nicht um einen syntrophen Prozess handelt. Das Archaeon könnte neben der Oxidation von Methan auch die Reduktion von Sulfat durchführen. Da das Sulfat reduzierende Archaeon *Archaeoglobus fulgidus* fast alle Gene und Enzyme der Methanogenese enthält (Klenk *et al.*, 1997) ist es prinzipiell denkbar, dass ein Organismus beide Prozesse durchführen kann. Das Vorliegen der auch in ihrem <sup>13</sup>C-Gehalt abgereicherten Biomarker für Sulfat-Reduzierer (Pancost *et al.*, 2000; Elvert *et al.*, 2003) ließe sich auch durch die Inkorporation des bei der Methan-Oxidation entstehenden Kohlendioxids erklären, wie es ebenfalls bei einem Transfer von Wasserstoff oder Elektronen der Fall sein müsste.

## **7. Die Kultivierung von Mikroorganismen und das Paradigma der Reinkultur**

Aufgrund vieler molekularbiologischer Habitatstudien wird davon ausgegangen, dass bisher nur 0,001 bis 1% aller in der Natur vorkommenden Mikroorganismen unter Laborbedingungen kultiviert wurden (Jones, 1977; Kogure *et al.*, 1980; Amann *et al.*, 1995). Das unzureichende Wissen über die genauen Bedingungen, unter denen Mikroorganismen in der Natur leben, und die mangelnde Fähigkeit, diese im Labor zu simulieren, sind vermutlich die wesentlichen Faktoren für die geringen Kultivierungserfolge. Ein wichtiger Parameter sind Nährstoffkonzentrationen, die in Kulturmedien meist unnatürlich hoch sind und zu einem nährstoffinduzierten Tod führen können („substrate-accelerated-

death“; Postgate & Hunter, 1964). Außerdem können Zellen in physiologischen Zuständen wie „viable but nonculturable“ (Roszak & Colwell, 1987) oder im Ruhezustand vorliegen, die ein Anwachsen in herkömmlichen Kulturmedien nicht zulassen (Bruns *et al.*, 2002). Gängige Methoden zur Isolierung von Mikroorganismen aus natürlichen Proben sind die Anreicherung und die direkte Verdünnung. Eine Anreicherung selektiert schnell wachsende, aber nicht unbedingt häufige Organismen. In einer direkten Verdünnungsreihe aus dem Probenmaterial dagegen sollten in den höheren Verdünnungsstufen die häufigsten, aber eventuell langsameren Organismen wachsen. Dennoch bleiben sehr langsam wachsende Organismen möglicherweise unentdeckt. Meist repräsentieren die so isolierten Organismen nur einen kleinen Teil der an einem natürlichen Standort vorkommenden Population oder sie lassen sich *in situ* gar nicht nachweisen (Giovannoni *et al.*, 1990; Ward *et al.*, 1990; Schmidt *et al.*, 1991). Dominante Organismen werden nur selten isoliert (Pinhassi *et al.*, 1997; Wieringa *et al.*, 2000).

Zudem wird häufig bei der Isolierung von Reinkulturen die komplexe Struktur der natürlichen Gemeinschaft mit möglichen Interaktionen durch Zell-Zell-Kontakt oder durch syntrophe Katabolitübertragung vernachlässigt (Caldwell *et al.*, 1997; Schink, 1997; Bruns *et al.*, 2002, 2003). Um Populationsanalysen auf der Grundlage der eingeschränkten Kultivierungsmöglichkeiten zu umgehen, wurden kultivierungsunabhängige molekulare Methoden entwickelt. Die Analyse der DNA der gesamten mikrobiellen Population eines Standortes durch DNA-Reassoziationskinetiken ermöglicht eine genauere Abschätzung der Komplexität einer mikrobiellen Gemeinschaft (Ritz *et al.*, 1997; Torsvik *et al.*, 2002). 16S rRNA Genanalysen und FISH erlauben zudem die Identifizierung dominanter Spezies (Ward *et al.*, 1990; Amann *et al.*, 1996). Allerdings lässt sich so nicht oder nur begrenzt erkennen, ob und in welchem Maße die vorhandenen Organismen aktiv sind und nur selten gibt es Hinweise auf den Stoffwechsellyp (Fry, 1990; Karner & Fuhrman, 1997).

Die Gründe für den mangelnden Erfolg bei der Kultivierung anaerob Methan oxidierender Mikroorganismen sind noch nicht abschließend geklärt. An den untersuchten Standorten wurden meist hohe Raten der AOM festgestellt, die verantwortlichen Organismen sind demnach *in situ* sehr aktiv. Bestimmungen der zellspezifischen, Methan abhängigen Sulfat-Reduktionsrate (42  $\mu\text{mol}$  pro Tag und mg Zellmasse [Trockengewicht]) zeigen, dass diese im Bereich der Aktivität von kultivierten anaeroben Bakterien liegt

(15 – 430  $\mu\text{mol}$  pro Tag und mg Zellmasse [Trockengewicht]; Boetius *et al.*, 2000; Rabus *et al.*, 2003). Die geringe Energieausbeute der anaeroben Oxidation von Methan (je nach Standort etwa zwischen  $-20$  und  $-50$  kJ/mol) lässt ein langsames Wachstum dieser Organismen vermuten. Unter Laborbedingungen ist die anaerobe Oxidation von Methan eventuell auch durch die geringe Konzentration an gelöstem Methan limitiert: Bei atmosphärischem Druck sind nur etwa 1,3 mmol/l Methan in Lösung (Yamamoto *et al.*, 1976). Die Löslichkeit von Methan steigt allerdings proportional mit dem Druck: In einer Wassertiefe von 800 m und Methansättigung lägen demnach 80 mmol/l vor. Die Erhöhung der Konzentration eines Eduktes, in diesem Fall Methan, erhöht die frei werdende Energie des Gesamtprozesses. Zumindest am Hydratrücken dienen die anaerob Methan oxidierenden Mikroorganismen als Nahrung für Organismen in höheren trophischen Stufen. Die Wachstumsrate der methanotrophen Mikroorganismen muss also hoch genug sein, um diese Dezimierung auszugleichen (Levin & Michener, 2002). Einen ersten Hinweis auf Wachstum von anaerob Methan oxidierenden Organismen bei atmosphärischem Methanpartialdruck, gab es durch die Langzeitinkubation von intakten Sedimentkernen in einem kontinuierlichen Durchflussreaktor (Girguis *et al.*, 2003). In dieser Untersuchung wurde eine Zunahme der Aktivität sowie der Anzahl von 16S rRNA Genen von Organismen aus der ANME-1 und ANME-2 Gruppe in vormals inaktiven Kernen festgestellt.

## **8. Die untersuchten Standorte**

### **8.1. Der Hydratrücken vor der Küste Oregons, USA**

Als „Hydratrücken“ (engl. Hydrate Ridge) wird der zweite Akkretionsrücken der Cascadia Subduktionszone bezeichnet; hier schiebt sich durch tektonische Aktivität die Juan-de-Fuca-Platte unter die nordamerikanische Platte. Dabei kommt es zu dynamischen Prozessen, unter anderem zur Bildung und Dissoziation von Gashydraten, sowie zum Aufsteigen von Fluiden und Methan aus tiefen Sedimentschichten in die Wassersäule (Torres *et al.*, 2002; Tryon *et al.*, 2002). Wegen des hohen hydrostatischen Drucks (780 bar) und der niedrigen Temperatur (ca.  $4^{\circ}\text{C}$ ) kommt es zur Bildung von Gashydraten, die sich nahe der Sedimentoberfläche befinden (Suess *et al.*, 1999). Auf dem südlichen Gipfel in 780 m Wassertiefe wurden die bisher höchsten Methan abhängigen Sulfat-

Reduktionsraten bestimmt ( $11 \mu\text{mol d}^{-1} \text{g}_{\text{dw}}^{-1}$ ; Boetius *et al.*, 2000). Da der Eintrag an organischem Kohlenstoff ansonsten gering ist, wird nur wenig Sulfat durch andere Elektronendonatoren als Methan reduziert. Die aus den hohen Sulfat-Reduktionsraten resultierende intensive Produktion von Sulfid ist die Grundlage für chemolithotrophe Mikroorganismen. Die Art der Besiedlung des Sedimentes hängt von der Steilheit der Sulfid- und Sauerstoffgradienten im Sediment ab. Bei sehr hohen Sulfidflüssen und sehr steilen Gradienten findet man dichte Matten der Sulfid oxidierenden Bakterien *Beggiatoa*. Bei geringerem Sulfidfluss wachsen Muscheln der Gattung *Calyptogena* und bei noch geringerem Fluss solche der Gattung *Acharax*, die beide Sulfid oxidierende Bakterien als Symbionten in ihren Kiemen beherbergen und durch ihre Wühlätigkeit die Eindringtiefe des Sauerstoffs erhöhen (Sahling *et al.*, 2002). Umgekehrt lässt sich von der Art der Besiedlung auf die Intensität und die Sedimenttiefe der anaeroben Methan-Oxidation schließen (Treude *et al.*, 2003a). Trotz des hohen Methanflusses aus tieferen Sedimentschichten gelangt nur ein Teil in die Wassersäule. Unter *Beggiatoa*-Matten werden 50% des Methans bereits anaerob oxidiert. *Calyptogena*-Felder emittieren weniger als 15% des aufsteigenden Methans und aus *Acharax*-Feldern gelangt kein Methan in die Wassersäule (Treude *et al.*, 2003a). Die Nettoproduktion von  $\text{HCO}_3^{3-}$  und  $\text{HS}^-$  durch die AOM und die damit zunehmende Alkalinität fördern insbesondere im anoxischen Bereich die Ausfällung von Kalziumkarbonat ( $\text{CaCO}_3$ ). Dieses stellt somit eine Kohlenstoffs Senke dar (Boetius & Suess, 2003). Der niedrige  $\delta^{13}\text{C}$ -Gehalt des Karbonats weist auf die Herkunft des Kohlenstoffs aus der Methan-Oxidation hin (Luff & Wallmann, 2003; Elvert *et al.*, 2000).

In den Sedimenten des Hydratrückens wurden außerdem hohe Konzentrationen an Biomarkern gefunden, die eine starke Anreicherung des  $^{13}\text{C}$ -Isotops aufwiesen und somit vermutlich von anaerob Methan oxidierenden Organismen stammen. Es handelt sich z.B. um Crocetane und Archaeol (Boetius *et al.*, 2000; Elvert *et al.*, 2001), die beide typisch für methanogene Archaeen sind, sowie um für SRB spezifische Fettsäuren mit 14 und 16 C-Atomen (Elvert *et al.*, 2003). Boetius *et al.* (2000) konnten hier erstmals das bereits erwähnte vermutlich für die anaerobe Oxidation von Methan verantwortliche Konsortium nachweisen. Es besteht aus einem inneren Bereich von Archaeen, die phylogenetisch eine eigene Gruppe innerhalb der Methanosarcinales bilden (ANME-2; Hinrichs *et al.*, 1999). Eine Hülle aus Sulfat-Reduzierern der Gruppe *Desulfosarcina/Desulfococcus* umgibt

diesen inneren Kern. Ein durchschnittliches Konsortium hat einen Durchmesser von 3  $\mu\text{m}$  und enthält etwa 300 Zellen von denen ein Drittel Archaeen und zwei Drittel SRB sind (Boetius *et al.*, 2000). Die Konsortien machen 90% der mikrobiellen Biomasse aus und sind in dem Sedimenthorizont mit der höchsten Methan-Oxidationsrate am häufigsten (Boetius *et al.*, 2000). Die gute Beschreibung dieses Standortes und der hohe Gehalt an offensichtlich aktiven anaerob Methan oxidierenden Konsortien sind gute Voraussetzungen für physiologische Untersuchungen unter Laborbedingungen, wie sie in der vorliegenden Arbeit durchgeführt wurden.

## **8.2. Das nordwestliche Schelf des Schwarzen Meeres**

Das Schwarze Meer ist der größte meromiktische Wasserkörper auf der Erde. Die Halokline bei 120 bis 170 m Wassertiefe verhindert eine Durchmischung der Wasserkörper, so dass der schwerere Wasserkörper permanent anoxisch und sulfidisch ist; Er bietet damit keinen Lebensraum für höhere Organismen. Tiefe Fluid- und Gasaustritte, auch aus Schlammvulkanen, wurden in Schelfgebieten beobachtet und stellen vermutlich die hauptsächlichsten Methanquellen dar; in größeren Wassertiefen kommen auch Gashydrate vor. Dass es sich hier um mikrobiologisch produziertes Methan handelt zeigt wiederum das  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnis. Anhand des  $^{14}\text{C}$ -Gehalts wird ersichtlich, dass es vermutlich vor etwa 3500 bis 5000 Jahren aus Sapropelen entstanden ist. Besonders in dem Schelfgebiet westlich der Halbinsel Krim wurden massive Gaslagerstättenentdeckt und es gibt Hinweise für explosive Gaseruptionen in diesem Gebiet (Sorokin, 2002).

In dem Schelfgebiet der Halbinsel Krim wurden auch Karbonatausfällungen mit niedrigem  $\delta^{13}\text{C}$ -Wert gefunden (Peckmann *et al.*, 2001; Thiel *et al.*, 2001; Lein *et al.*, 2002). In 230 m Tiefe werden sie bis zu vier Metern hoch und sind mit Mikroorganismen assoziiert, die vermutlich anaerob das, durch die Hohlräume der Strukturen strömende Methan oxidieren (Pimenov *et al.*, 1997; Michaelis *et al.*, 2002). Die Mikroorganismen kommen als mehrere Zentimeter dicke, rosafarbene Matten vor und können  $^{14}\text{C}$  markiertes Methan zu  $^{14}\text{C}$ - $\text{CO}_2$  umsetzen (Pimenov *et al.*, 1997; Michaelis *et al.*, 2002). Die Matten enthalten stark  $^{13}\text{C}$ -abgereicherte Biomarker, die typisch für anaerob Methan oxidierende mikrobielle Gemeinschaften sind (Hinrichs & Boetius, 2002; Michaelis *et al.*, 2002).

16S rRNA Gensequenzanalysen zeigen, dass hier im Unterschied zum Hydratrücken, die ANME-1 Gruppe den Hauptteil der archaeellen Biomasse und ca. 20% der Gesamtzellzahl ausmacht (Michaelis *et al.*, 2002; Knittel pers. Mitteilung). Die bakterielle Biomasse wird auch hier von Organismen der *Desulfosarcina/Desulfococcus* Gruppe dominiert, die 11% der Gesamtzellzahl ausmacht (Michaelis *et al.*, 2002; Knittel pers. Mitteilung). Neben diesen dominanten Organismen kommt noch eine Vielzahl anderer Mikroorganismen mit geringerem Anteil in den Matten vor (Knittel, pers. Mitteilung).

Die unterschiedliche Struktur und Phylogenie der anaerob Methan oxidierenden Organismen macht diesen Standort als vergleichendes Untersuchungsgebiet attraktiv. Auch die physikalischen und chemischen Eigenschaften des Schwarzen Meeres unterscheiden sich von denen des Pazifik durch eine geringere Salinität (22‰ anstelle von 33‰), geringere Sulfatkonzentration (17 mmol/l statt von 28 mmol/l), höhere Temperatur (8 °C gegenüber von 4 °C) und geringere Wassertiefe der Zone mit AOM (230 m anstelle von 780 m). All diese Parameter können über Jahrzehnte und Jahrhunderte die Selektion von Mikroorganismen aufgrund deren spezifischer Merkmale beeinflussen und machen physiologische Vergleiche interessant.

## 9. Ziele der vorliegenden Arbeit

Der Zugang zu Proben aus Sedimenten mit intensiver AOM ermöglichte die folgenden experimentellen Vorhaben, die zuvor mit weniger aktiven Proben nicht möglich waren:

- In Inkubationen mit Sediment sollte durch die direkte Messung des Methanverbrauchs und der Bildung von Sulfid aus der Reduktion von Sulfat bestimmt werden, ob beide Prozesse gemäß der erwarteten Stöchiometrie von 1:1 erfolgen.
- Die vertikale Verteilung der Aktivität der AOM in Sedimenten mit verschiedenen Oberflächenbesiedlungen vom Hydratrücken sollte in Laborinkubationen untersucht werden. Auch tiefere gashydrathaltige Sedimentschichten und reines Gashydrat wurden so auf die Aktivität anaerob Methan oxidierender Organismen hin untersucht.
- Der Einfluß von Temperatur, Methanpartialdruck, Salinität, Sulfatkonzentration und pH – Wert auf die Intensität der AOM sollte untersucht werden. Dabei wurden Sedimente vom Hydratrücken und mikrobielle Matten aus dem Schwarzen Meer verglichen.
- Da bei der anaeroben Methan-Oxidation das Vorliegen einer Syntrophie diskutiert wird, galt dem dabei interzellulär übertragenen Intermediat, das noch unbekannt ist, besonderes Interesse.
- Des Weiteren sollte mit der Anreicherung der für die anaerobe Oxidation von Methan verantwortlichen Organismen begonnen werden. Ferner sollte als auch versucht werden, die beiden Partner der syntrophen Gemeinschaft in getrennter Form, – das methanogene Archaeon und das Sulfat reduzierende Bakterium – zu isolieren.
- Die  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnisse von Methan und  $\text{CO}_2$  werden in Umweltstudien verwendet, um die Art der Bildung und den Abbauweg des Methans zu verstehen. Da dies nur möglich ist, wenn die Fraktionierungs-Faktoren dieser Prozesse bekannt sind, sollte in dieser Arbeit erstmals der  $\delta^{13}\text{C}$ -Wert des verbleibenden Methans während der Oxidation bestimmt werden.



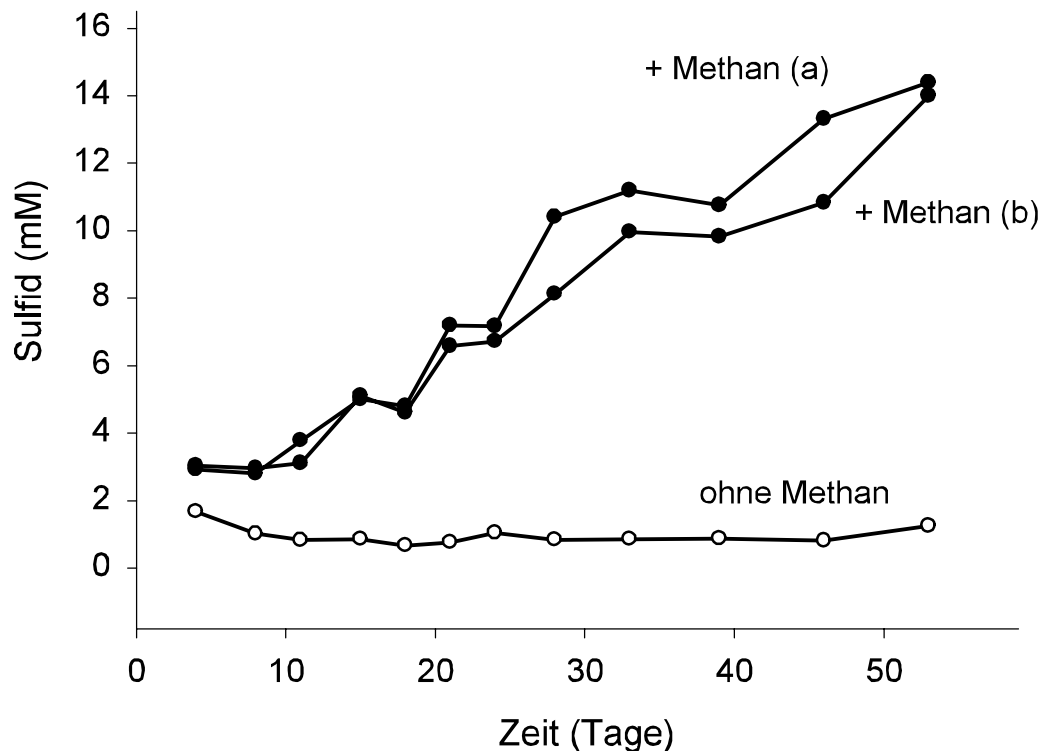
## **B Ergebnisse und Diskussion**

In der vorliegenden Arbeit wurde die anaerobe Oxidation von Methan (AOM) gekoppelt an die Reduktion von Sulfat in Laborexperimenten untersucht. Es gelang erstmals, den Prozess unter *in vitro* Bedingungen stabil und reproduzierbar zu etablieren. In Experimenten mit natürlichen Sedimentproben wurden grundlegende physiologische Aspekte des Prozesses aufgeklärt und Versuche zur Interaktion der beiden Partnerorganismen durchgeführt. Ferner wurde zum ersten Mal ein Wachstum anaerob Methan oxidierender Konsortien festgestellt und über zwei Jahre verfolgt. Außerdem wurde die  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Fraktionierung während der Oxidation von Methan untersucht.

### **1. Anaerobe Methanoxidation in verschiedenen Mikrohabitaten des Hydratrückens**

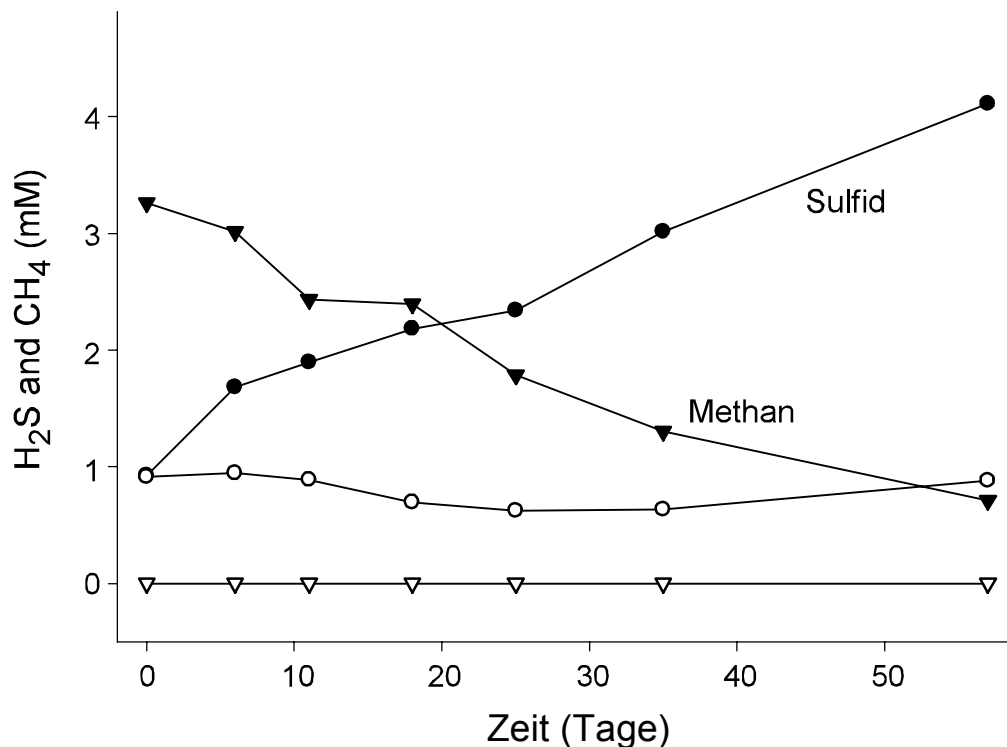
#### **1.1. AOM in Oberflächensedimenten**

Als Oberflächensedimente werden im Folgenden Proben aus einer Sedimenttiefe bis etwa 30 cm Tiefe bezeichnet. Boetius *et al.* (2000) zeigten, dass sowohl die höchsten Aktivitäten der AOM als auch die höchste Anzahl der Konsortien in einer Tiefe von 1–4 cm in Sedimenten mit einer Oberflächenbesiedlung durch das Bakterium *Beggiatoa* vorkommen. Mit Proben aus diesem Bereich konnte der Prozess der anaeroben Oxidation von Methan in dieser Arbeit auch erstmals unter Laborbedingungen nachgewiesen werden. Die Sulfat-Reduktion war eindeutig von einem Zusatz von Methan als Elektronendonator abhängig (Abb. 1). Während der Oxidation von Methan wurde in einem molaren Verhältnis von 1:1 Sulfid aus der Reduktion von Sulfat gebildet (Abb. 2). Die am Anfang und am Ende des Experimentes bestimmte Sulfatkonzentration bestätigte dieses stöchiometrische Verhältnis zwischen oxidiertem Methan und reduziertem Sulfat. Ein solcher Nachweis ist noch direkter als bisherige Messungen mit radioaktiv markierten Substanzen, bei denen die Prozesse (Sulfat-Reduktion und Methan-Oxidation) in getrennten Proben gemessen werden. In Laborversuchen dauerte es allerdings etwa 60 Tage, bis eine Sulfidkonzentration von 15 mmol/l erreicht war, während bei radioaktiven Messungen meist nur 12–24 h inkubiert wird. (Diese Daten Abschnitts sind in Manuskript 1 veröffentlicht [siehe Teil II]).



**Abb. 1** Produktion von Sulfid aus Sulfat mit Methan als Elektronendonator in Sediment-Medium-Gemischen vom Hydratrücken in Inkubationen unter anoxischen Bedingungen in einem Zeitraum von 55 Tagen. Zwei Parallelen mit Methan (●) und eine Kontrolle ohne Methan (○).

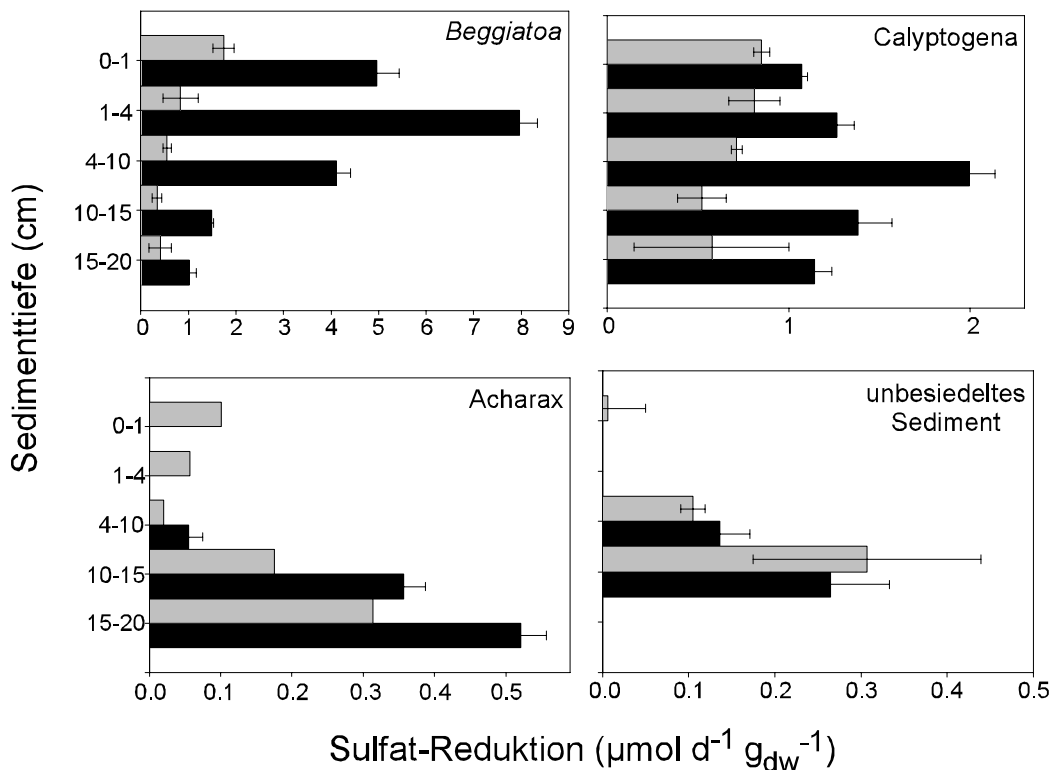
Um die Verteilung der Aktivität der AOM am Hydratrücken über die Tiefe des Sedimentes in Laborexperimenten zu untersuchen, wurden Sediment-Medium-Gemische aus verschiedenen Tiefen inkubiert. Die Sedimentkerne wurden direkt nach der Probenahme an Bord des Schiffes in Abschnitte verschiedener Tiefe (s.u.) unterteilt. Um zu verhindern, dass die Aktivität der Organismen durch die Probenahme beeinträchtigt wird, wurden die Sedimente unter anoxischen Bedingungen bei 4 °C gelagert und so ins Heimatlabor transportiert. Hier wurden Sediment-Medium-Gemische hergestellt und jeweils drei Replikate inkubiert. Die Zunahme von Sulfid wurde photometrisch mit dem Nachweis über Kupfersulfat (Cord-Ruwisch, 1985) während einer Inkubationszeit von 60 Tagen bestimmt und aus den gemessenen Werten wurde eine Rate berechnet. Es wurde jeweils ein Kern mit der für verschiedene Methanflüsse typischen Besiedlung durch *Beggiatoa*, *Calyptogena* oder *Acharax* (siehe Einleitung) in fünf Abschnitte unterteilt (0 – 1 cm, 1 – 4 cm



**Abb. 2** Der Verbrauch von Methan (▼) und gleichzeitig die Bildung Sulfid (●) in einem experimentellen Ansatz. Die entsprechenden offenen Symbole zeigen die Konzentrationen von Sulfid und Methan in einem Ansatz ohne Methan.

4 – 10 cm, 10 – 15 cm und 15 – 20 cm; Abb. 3). Als Referenz wurden die ersten vier Tiefenabschnitte eines Kerns verwendet, der nicht besiedelt war. Die höchste von Methan abhängige Sulfat-Reduktionsrate ( $8 \mu\text{mol d}^{-1} \text{g}_{\text{dw}}^{-1}$ ) wurde in 1 – 4 cm Tiefe unter einer *Beggiatoa*-Matte festgestellt. Unter dem *Cayptogena*-Feld lag das Maximum der Aktivität in 4 – 10 cm Tiefe, erreichte aber lediglich  $2 \mu\text{mol d}^{-1} \text{g}_{\text{dw}}^{-1}$ . Das Sediment unter der Besiedlung durch die Muschel *Acharax* hatte ein sehr geringes Aktivitätsmaximum von  $0,5 \mu\text{mol d}^{-1} \text{g}_{\text{dw}}^{-1}$  in einer Tiefe von 15 – 20 cm. Die Aktivitäten in dem unbesiedelten Sediment waren noch geringer (Abb. 3). Diese Ergebnisse zeigen, dass ein höherer Methanfluss im Sediment auch zu einer höheren Aktivität der AOM führt. Sie stimmen auch mit Werten überein, die durch radioaktiv markierte Substanzen ermittelt wurden (Treude pers. Mitteilung). Dies zeigt, dass die Probenahme an Bord, die Lagerung und der Transport ins Heimatlabor keinen negativen Einfluss auf die Aktivität der Proben haben,

und somit der Vergleich der Ergebnisse beider Methoden zulässig ist. Fraglich bleiben muss hingegen die Übertragung dieser im Labor gewonnenen Daten auf die tatsächliche Aktivität *in situ*, denn noch ist es nicht möglich, Raten direkt am Meeresboden zu bestimmen. Es liegt somit keine Abschätzung vor, inwieweit der Druckunterschied zwischen Meeresboden und Wasseroberfläche und der damit einhergehende Verlust von Methan einen Einfluss auf die Vitalität der Organismen hat. (Die Daten dieses Abschnitts wurden bisher nicht veröffentlicht).



**Abb. 3** Tiefenprofile der Methan abhängigen Sulfat-Reduktionsrate von Sedimenten des Hydratrückens unter einer *Beggiatoa*-Matte, einem *Calyptogena*-Feld, einem *Acharax*-Feld und unbesiedeltem Sediment. Inkubationen mit Methan (■) und Kontrollexperimente ohne Methan (■);  $n = 3 \pm \text{sd}$ . Die Skalierung der x-Achsen ist nicht einheitlich.

## 1.2. AOM in tieferen gashydrathaltigen Sedimentschichten

Um zu untersuchen, ob auch in tieferen gashydrathaltigen Sedimentschichten eine anaerobe Oxidation von Methan stattfindet, wurden Proben vom Hydratrücken aus bis zu 1,5 m Tiefe wie oben beschrieben untersucht. Innerhalb einer Inkubationszeit von über 12 Monaten konnte in keiner der Proben eine Sulfid Bildung festgestellt werden. Dies könnte daran

liegen, dass aufgrund eines Mangels am Elektronenakzeptor Sulfat die Population der anaerob Methan oxidierenden Organismen in tieferen Sedimentschichten kleiner ist. Da diese Proben während der Probenahme länger als die oben beschriebenen der Luft ausgesetzt waren, könnte auch der Sauerstoffkontakt die Organismen geschädigt haben.

Sedimentproben aus 7 bis 92 m Sedimenttiefe, vom Schelf vor Peru, wurden ebenfalls auf die Aktivität anaerob Methan oxidierender Mikroorganismen hin untersucht. Diese Proben wurden von dem Ocean-Drilling-Programm zur Verfügung gestellt und stammen aus Bereichen, in denen sowohl Methan als auch Sulfat im Porenwasser gemessen wurden. Auch hier konnte während einer Inkubation von über einem Jahr keine Sulfid Bildung als Produkt der von Methan abhängigen Sulfat-Reduktion festgestellt werden. Die Methan-Sulfat-Übergangszonen sind jedoch oft nur schmale Bereiche, und da nicht in lückenlosen Intervallen beprobt wurde, fehlten unter den zur Verfügung stehenden Proben womöglich die aktiven Stellen. In den untersuchten Sedimenten war die Population der Organismen, die Methan anaerob oxidieren können, vermutlich auch sehr klein. Darauf deutet jedenfalls die nach viermonatiger Inkubation sehr niedrige, mit radioaktiven Substanzen ermittelte, Aktivität von einigen  $\text{pmol d}^{-1} \text{ g}_{\text{dw}}^{-1}$  hin (Treude, pers. Mitteilung). (Die Daten dieses Abschnitts wurden bisher nicht veröffentlicht).

### **1.3. AOM in Gashydraten**

Gashydrate stellen am Hydratrücken die Quelle des von anaerob Methan oxidierenden Organismen umgesetzten Methans dar. Es stellt sich daher die Frage, ob solche Mikroorganismen auch in Sedimenten mit Einschlüssen von Gashydrat und in reinem Gashydrat vorkommen (Abb. 4). Hierzu wurde die Aktivität der AOM in entsprechenden Proben wiederum über die Bildung von Sulfid aus der Sulfat-Reduktion bestimmt. Das Gashydrat wurde zuvor unter anoxischen Bedingungen geschmolzen. Die Aktivität in hydrathaltigem Sediment war mit einer Sulfat-Reduktionsrate von  $0,36 \mu\text{mol d}^{-1} \text{ g}_{\text{dw}}^{-1}$  fast eine Größenordnung geringer als in Sedimenten unterhalb einer *Beggiatoa*-Matte. Das geschmolzene Hydrat zeigte keinerlei Aktivität, auch nicht in zusätzlich durchgeführten Inkubationen unter erhöhtem Methanpartialdruck (1,1 MPa anstelle von 0,1 MPa). Molekularbiologische Analysen zeigten, dass sowohl die Gesamtzellzahl, als auch die

Anzahl der anaerob Methan oxidierenden Organismen in geschmolzenem Hydrat entsprechend geringer ist als in Oberflächensedimenten (Wellsbury *et al.*, 2000; Lösekann pers. Mitteilung). Ursache hierfür ist vermutlich wiederum der Mangel an Sulfat. (Die Daten dieses Abschnitts wurden bisher nicht veröffentlicht).



**Abb. 4** (A) Sediment mit Einschlüssen von Gashydrat. (B) Reines Gashydrat bevor es geschmolzen wurde.

## 2. Der Einfluß physikalischer und chemischer Parameter auf die AOM

Die Temperatur, die Konzentrationen von Methan und Sulfat, die Salinität und der pH-Wert haben womöglich einen Einfluss auf die Aktivität der anaerob Methan oxidierenden Organismen. Die Untersuchung dieser Einflüsse kann zeigen, wie eng begrenzt der Bereich der höchsten Aktivität ist und ob sich die Aktivität der Organismen bei Veränderungen in der Umwelt verringert. Eine mögliche globale Erwärmung würde auch zur Erwärmung der Ozeane und dadurch vermutlich auch zu einer stärkeren Dissoziation von Gashydraten und einem höheren Methanfluss führen. In dieser Arbeit wurde daher der Einfluss der Methankonzentration und der Temperatur auf die Aktivität der AOM untersucht. Auch die Aktivität der AOM bei Variationen der Salinität, des pH-Wertes und der Sulfatkonzentration wurde in Experimenten untersucht. Proben von zwei Standorten mit AOM, aber unterschiedlichen Umweltbedingungen wurden hierbei verglichen. Die beiden Standorte differieren außerdem hinsichtlich der dominanten Archaeen in der mikrobiellen Population. Der Hydratrücken im Pazifik ist ein kaltes ( $4^{\circ}\text{C}$ ),

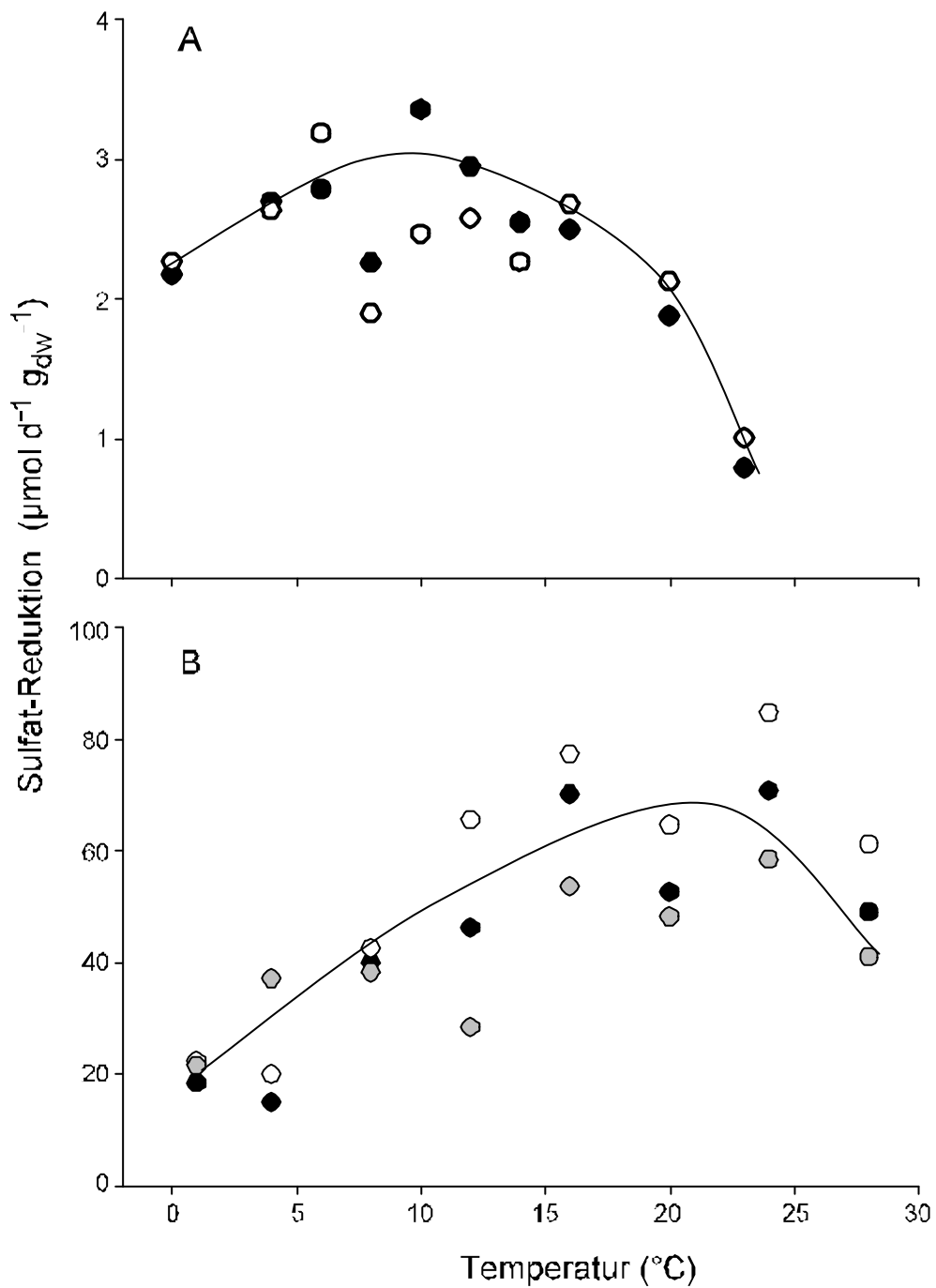
typisch marines (33‰ Salinität und 28 mmol/l Sulfat) Habitat in einer Wassertiefe von 780 m, in dem dissoziierende Gashydrate die Methanquelle sind. Die dominanten Archaeen in diesem Habitat gehören zu der ANME-2 Gruppe (Boetius *et al.*, 2000). Am nordwestlichen Schelf des Schwarzen Meeres dagegen sind Salinität und Sulfatgehalt niedriger (22‰; 17 mmol/l), die Temperatur ist jedoch höher (8°C). Das Methan strömt hier in einer Tiefe von 230 m gasförmig und gelöst aus dem Sediment. Die dominanten Archaeen in diesen Proben gehörten zu der ANME-1 Gruppe (Michaelis *et al.*, 2002).

Die Proben wurden in künstlichem Medium (Widdel & Bak, 1992) inkubiert. Die Gasphase enthielt Methan, das in Kontrollexperimenten durch Stickstoff ersetzt wurde. Vom Hydratrücken wurden Sediment-Medium-Gemische in den Experimenten eingesetzt. Die mikrobiellen Matten aus dem Schwarzen Meer wurden schonend zerkleinert, um eine möglichst homogene Verteilung zwischen den Replikaten der Versuchse zu erreichen.

Es zeigte sich, dass die Population vom Hydratrücken an kalte Bedingungen adaptiert ist. Zwischen 0°C und 16°C blieben die Raten der Sulfat-Reduktion mit Methan als Elektronendonator etwa konstant, nahmen jedoch bei höheren Temperaturen stark ab. Die *in situ* Temperatur am nordwestlichen Schelf des Schwarzen Meeres ist nur geringfügig höher als am Hydratrücken. Dennoch wies die Population des Schwarzen Meeres gleich bleibende Raten zwischen 12 und 24°C, aber deutlich geringere Raten bei niedrigeren Temperaturen auf (Abb. 5), so dass von einem mesophilen Temperaturprofil gesprochen werden kann.

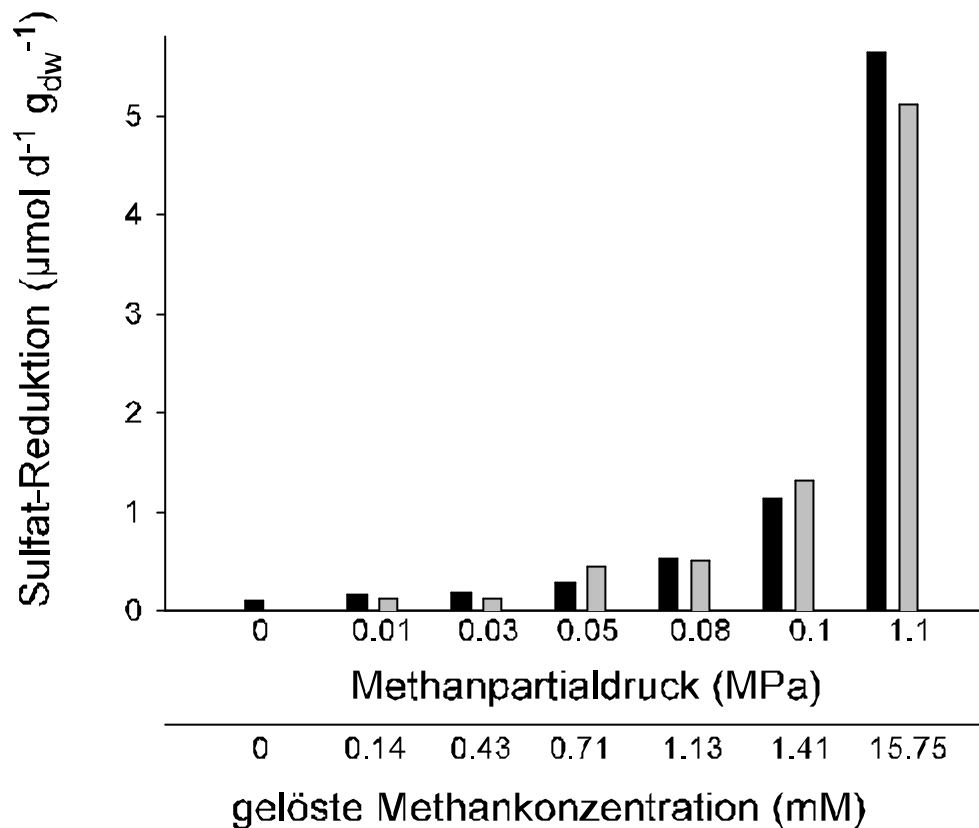
Eine Erhöhung des Methanpartialdrucks von 0,1 auf 1,1 MPa führte bei den Proben des Schwarzen Meeres zu einer zwei- bis dreifachen und bei den Proben vom Hydratrücken zu einer vier- bis fünffachen Steigerung der Aktivität. Partialdrücke unterhalb von 0,1 MPa führten dagegen zu verminderter Aktivität (Abb. 6). Aus technischen Gründen war es nicht möglich zu ermitteln, bei welchem Partialdruck eine Substratsättigung eintritt.

Die Proben vom Hydratrücken zeigten ein Aktivitätsmaximum bei pH 7,4, obwohl der *in situ* pH – Wert bei 8,25 liegt. Die Toleranz gegenüber pH – Schwankungen in den Proben vom Schwarzen Meer war größer: Hier waren die Aktivitäten zwischen pH 6,7 und 8,14 vergleichbar hoch, obwohl auch hier der *in situ* pH – Wert (8,5) höher lag. Trotz der unterschiedlichen *in situ* Salinität der Standorte zeigten beide Proben bei 22‰ und 33‰ unverändert hohe Aktivität. Bei 63‰, 14‰, 7‰ oder 0‰ war die Aktivität stark



**Abb. 5** Die von Methan abhängige Sulfat-Reduktion bei verschiedenen Temperaturen, (A) Proben vom Hydratücken (2 Replikate), (B) Proben aus dem Schwarzen Meer (3 Replikate). Die Trendlinien wurden per Hand eingefügt.





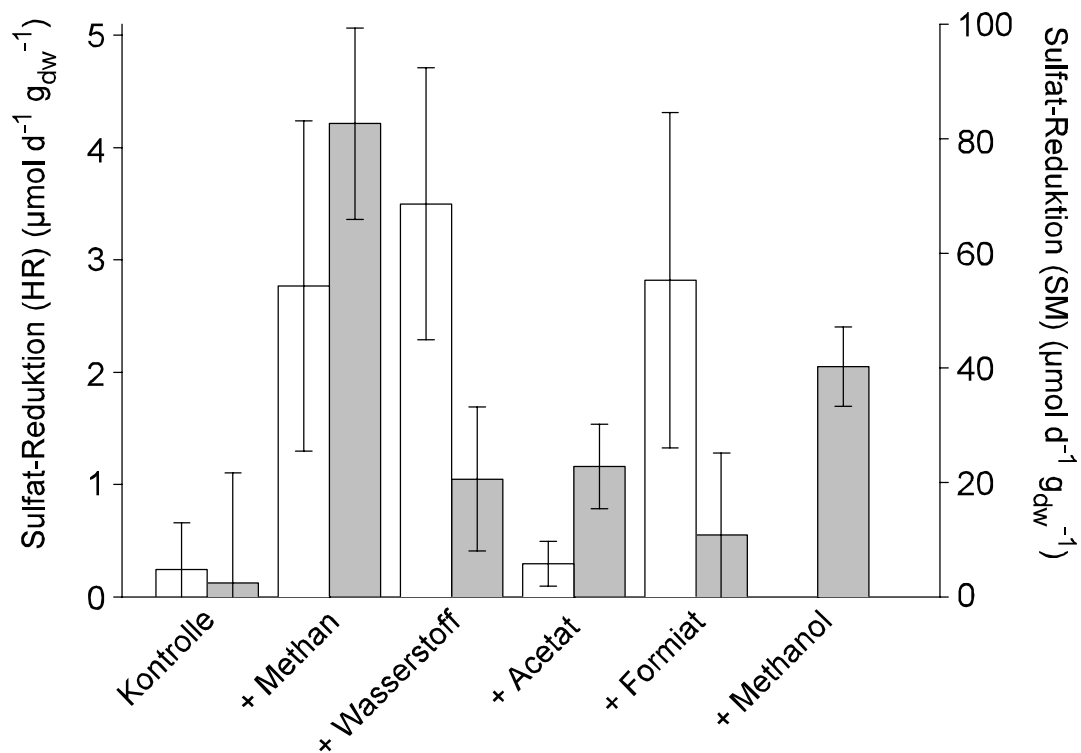
**Abb. 6** Sulfat-Reduktion in Abhängigkeit von dem Methanpartialdruck in Sediment Slurries vom Hydratrücken (jeweils 2 Replikate). Die x-Achse ist nicht skaliert.

vermindert. Sulfatkonzentrationen von 10 bis 100 mmol/l hatten in beiden Proben keinen Einfluss auf die Aktivität der AOM, ohne Sulfat war keine Aktivität feststellbar (die Salinitäts-, pH- und Sulfatkonzentrations-Toleranz der Proben vom Hydratrücken wurden von Martin Krüger und Ramona Appel bestimmt). Auch in den spezifischen Raten der Methan-Oxidation unterscheiden sich die Sedimente vom Hydratrücken und den mikrobiellen Matten aus dem Schwarzen Meer. Bezogen auf das Gesamttrockengewicht zeigen die mikrobiellen Matten ( $41 \pm 16 \mu\text{mol d}^{-1} \text{g}_{\text{dw}}^{-1}$ ) sehr viel höhere Raten bei atmosphärischem Methanpartialdruck als die Proben vom Hydratrücken ( $2,5 \pm 0,3 \mu\text{mol d}^{-1} \text{g}_{\text{dw}}^{-1}$ ). Berücksichtigt man allerdings, dass die Zelldichte in den mikrobiellen Matten höher ist als in den Sedimentproben und vergleicht zellspezifische

Raten, so ergibt sich, dass die Konsortien vom Hydratrücken aktiver sind ( $20 \text{ mmol d}^{-1} \text{ g}_{\text{dw}}^{-1}$  [Zellmasse]) als die Zellen in den Matten aus dem Schwarzen Meer ( $1 \text{ mmol d}^{-1} \text{ g}_{\text{dw}}^{-1}$  [Zellmasse]). (Die Daten dieses Abschnitts sind in den Manuskripten 1 und 3 enthalten).

### 3. Versuche zur Interaktion der an der AOM beteiligten Organismen

Viele Autoren nehmen an, dass die anaerobe Oxidation von Methan ein zweistufiger, syntropher Prozess ist, in dem Methan von einem Organismus oxidiert und Sulfat von einem anderen reduziert wird (Hoehler *et al.*, 1994; Hinrichs & Boetius, 2002). Unklar ist allerdings, welches Intermediat dabei übertragen wird. In der vorliegenden Arbeit wurde davon ausgegangen, dass die Zugabe des „richtigen“ Intermediates in nicht hemmenden Konzentrationen zu Proben ohne Methan den Sulfat reduzierenden Organismus unterhält und die Produktion von Sulfid sogar schneller erfolgt als mit Methan als indirektem Elektronendonator. Um die Anreicherung von Sulfat reduzierenden Bakterien zu vermeiden, die nicht an der anaeroben Oxidation von Methan beteiligt sind, wurde die Bildung von Sulfid nur über eine Woche verfolgt. In dem Versuch wurden die in der Literatur am meisten diskutierten Intermediate der AOM eingesetzt: molekularer Wasserstoff, Acetat, Methanol und Formiat (Zehnder & Brock, 1980; Hoehler *et al.*, 1994; Valentine & Reeburgh, 2000; Sørensen *et al.*, 2001). Die Proben vom Hydratrücken zeigten mit diesen Verbindungen niedrigere Raten als mit Methan allein, aber etwas höhere als die Kontrolle ohne Methan und ohne potentiell Intermediat (Abb. 7; Versuche wurden gemeinsam mit Martin Krüger durchgeführt). Die Proben aus dem Schwarzen Meer zeigten bei molekularem Wasserstoff und Formiat etwa so hohe Raten wie mit Methan, mit Acetat waren die Raten dagegen geringer (Abb. 7). In parallel durchgeführten Anreicherungen und Verdünnungsreihen wuchsen mit molekularem Wasserstoff und mit Formiat schnell Sulfat-Reduzierer, die phylogenetisch nicht zu der an der AOM beteiligten *Desulfosarcina/Desulfococcus* Gruppe gehörten. Wahrscheinlich sind die relativ hohen Raten in diesem Experiment (Abb. 7) daher eher auf angereicherte Organismen zurückzuführen, und deuten nicht auf das im Konsortium verwendete Intermediat hin. (Die Daten dieses Abschnitts sind in den Manuskripten 1 und 3 enthalten).



**Abb. 7** Sulfat-Reduktion in Inkubationen von Sediment-Medium-Gemischen vom Hydratrücken (HR; ■) und mikrobiellen Matten aus dem Schwarzen Meer (SM; □) mit verschiedenen Elektronendonatoren im Vergleich mit Methan als Elektronendonator und einer Kontrolle ohne Elektronendonator.

In einigen Arbeiten wurde versucht, die Beteiligung von Sulfat-Reduzierern und Methanogenen an der anaeroben Oxidation von Methan durch den Einsatz spezifischer Inhibitoren nachzuweisen (Molybdat und BES; Zehnder *et al.*, 1979; Alperin & Reeburgh, 1985; Iversen *et al.*, 1987; Oremland & Capone, 1988; Hoehler *et al.*, 1994; Hansen *et al.*, 1998). Die widersprüchlichen Ergebnisse dieser Untersuchungen lassen allerdings keine allgemeine Schlussfolgerung zu. Dennoch wurde auch in dieser Arbeit der Effekt von Molybdat und BES auf die AOM in Proben vom Hydratrücken und aus dem Schwarzen Meer untersucht. Der Prozess der AOM wurde in beiden Proben durch BES gehemmt. Da BES spezifisch die Methylcoenzym-M-Reduktase hemmt, die den letzten Schritt der Methanogenese katalysiert, zeigt die Hemmung der AOM durch BES die biochemische Ähnlichkeit beider Prozesse. Nach Zugabe von Molybdat konnte in den Proben vom Hydratrücken keine AOM mehr festgestellt werden. Die Proben aus dem Schwarzen Meer

dagegen wiesen auch mit Molybdat noch etwa ein Drittel der Sulfid Produktion von Inkubationen ohne Molybdat auf. Zumindest Wasserstoff verwertende SRB waren durch Molybdat effektiv gehemmt. Denn der in allen Inkubationen in den ersten Tagen produzierte Wasserstoff wurde lediglich in den Ansätzen mit Molybdat nicht wieder verbraucht. Bei Versuchen mit Inhibitoren muss beachtet werden, dass sowohl Molybdat als auch BES den jeweiligen Prozess inhibieren, nicht aber den Organismus selbst. Die Hemmung der Prozesse ist jedoch unabhängig davon, ob sie in zwei verschiedenen in einer Syntrophie zusammenwirkenden Mikroorganismen stattfinden, oder aber in nur einem Organismus. Es ist daher nicht auszuschließen, dass auch ein Organismus alleine in der Lage ist, beide Prozesse durchzuführen. Das Sulfat reduzierende Archaeon *Archaeoglobus fulgidus* ist ein Beispiel dafür, dass ein Organismus grundsätzlich sowohl zur Sulfat-Reduktion als auch zur Methanogenese (und damit auch zur „reversen Methanogenese“) fähig sein könnte. *A. fulgidus* besitzt nämlich neben der Fähigkeit zur Reduktion von Sulfat fast alle Enzyme der Methanogenese. Da die Methyl-Coenzym-M-Reduktase fehlt, ist *A. fulgidus* allerdings nicht in der Lage Methan zu produzieren (Klenk *et al.*, 1997). Selbst wenn es sich beim anaeroben Abbau von Methan um keine syntrophe Kooperation handelt, so spricht die enge räumliche Assoziation und die Schwierigkeit, den Sulfat-Reduzierer zu isolieren, zumindest für eine enge Kopplung der beiden Organismen. (Diese Daten sind in Manuskript 3 enthalten).

Zudem wurde die Wirkung von Antibiotika (Ampicillin, Kanamycin), die speziell gegen Bakterien, nicht aber gegen Archaeen wirken (Dawson *et al.*, 1986), auf die AOM untersucht. Die spezifische Hemmung von Sulfat-Reduzierern und die Unempfindlichkeit von Methanogenen wurde vorher mit Anreicherungen überprüft. Proben beider Standorte zeigten allerdings auch in Inkubationen mit Antibiotika unverändert hohe von Methan abhängige Sulfat-Reduktionsraten. Einerseits könnte dies als Indiz für die Katalyse der AOM allein durch den archaeellen Partner gesehen werden, andererseits wirken Antibiotika jedoch nur gegen das Zellwachstum. Da der Katabolismus hingegen nicht gehemmt wird, wurden somit die sehr langsam wachsenden Organismen der AOM eventuell gar nicht beeinträchtigt. (Diese Daten sind in Manuskript 3 enthalten).

Ob es sich um eine echte Syntrophie handelt und welches Intermediat verwendet wird, konnte im Rahmen der hier durchgeführten Versuche nicht abschließend geklärt

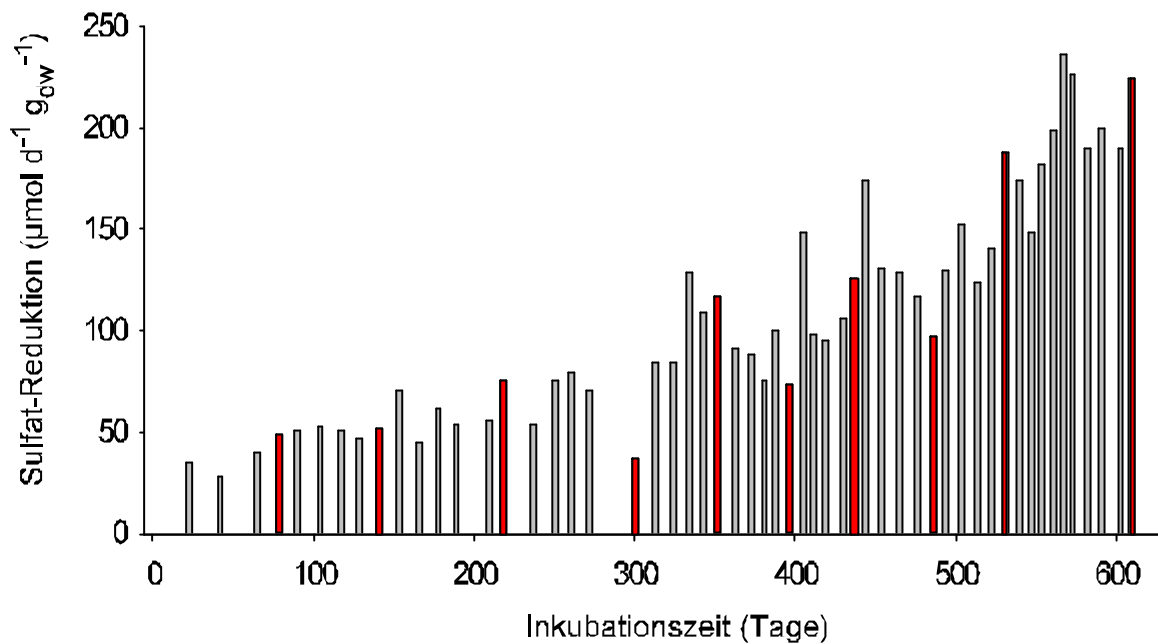
werden. Ohne eine Reinkultur der Konsortien oder getrennte Kulturen beider Partnerorganismen, werden diese Fragen wohl nicht zu beantworten sein.

#### **4. Isolierung und Wachstum von Organismen aus Proben mit AOM**

##### **4.1. Sulfat-Reduktionsraten und Wachstum von methanotrophen Konsortien vom Hydratrücken**

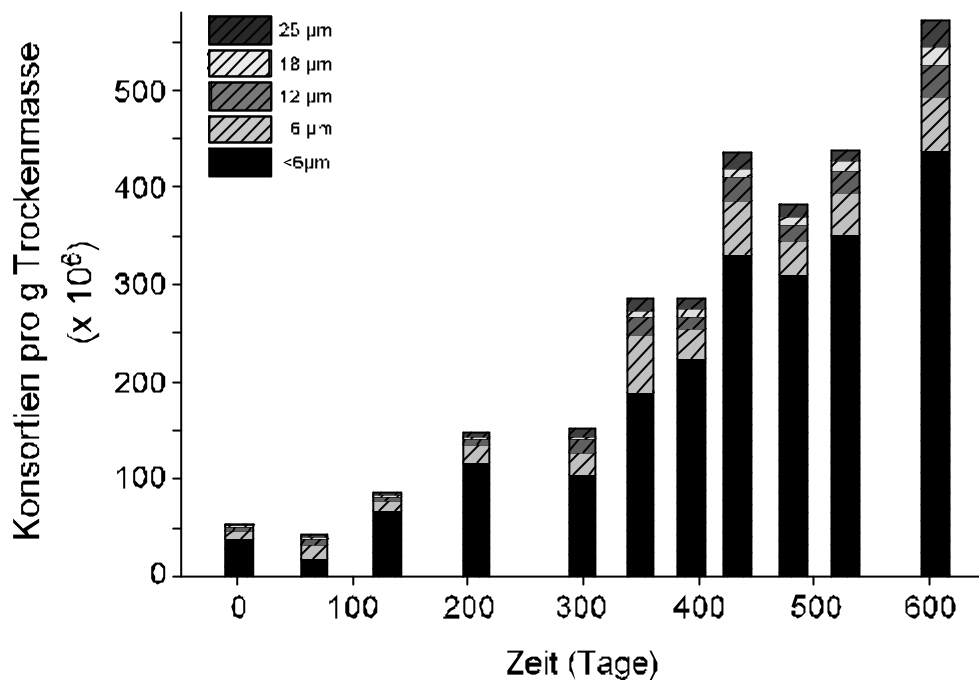
In aufeinander folgenden Inkubationen derselben Sedimentprobe mit einem erhöhten Methanpartialdruck wurde die Entwicklung der Sulfat-Reduktionsrate über einen Zeitraum von fast zwei Jahren beobachtet. Diese Inkubationen wurden in speziellen Druckgefäßen (siehe Manuskript 1) bei einem Methanpartialdruck von 1,37 MPa durchgeführt. Eine Inkubationsphase mit derselben Methanatmosphäre dauerte zu Beginn dieses Langzeitversuchs etwa 30 Tage. Durch den immer schnelleren Anstieg der Sulfidkonzentration reduzierte sich eine Inkubationsphase auf fünf Tage gegen Ende des Langzeitversuchs. Die Sulfidkonzentration stieg innerhalb einer Inkubationsphase auf 10 bis 14 mmol/l an. Zwischen zwei Inkubationsphasen wurden die Proben druckentlastet und die Sulfidkonzentration wurde bestimmt. Nach Absetzen des Sediments wurde das überstehende Medium ausgetauscht, so dass die Ansätze wieder 28 mmol/l Sulfat und nur noch 1 bis 3 mmol/l Sulfid enthielten. Die Röhrchen wurden dann erneut mit Methan begast und wieder unter Druck gesetzt. In zwei Parallelen (A, B) steigerte sich die Aktivität innerhalb des gesamten Zeitraums um das 6,5fache. Da beide Parallelen dieselben Ergebnisse lieferten, wird im Folgenden nur auf eine Parallele (A) eingegangen; auch Abb. 8 und 9 stellen Ergebnisse dieser Parallele dar. Die von Methan abhängige Sulfat-Reduktionsrate betrug in der letzten Inkubationsphase  $0,23 \text{ mmol d}^{-1} \text{ g}_{\text{dw}}^{-1}$ ; dies übersteigt die höchste je am Hydratrücken mit radioaktiv markierten Substanzen bestimmte Rate um das 20fache (Boetius & Suess, 2003). Auch bei atmosphärischem Methanpartialdruck stieg die Aktivität in aufeinander folgenden Inkubationen allerdings deutlich weniger als bei erhöhtem Partialdruck.

Nach jeder fünften Inkubationsphase wurde aus beiden Parallelen des Langzeitversuchs jeweils eine Probe entnommen (rote Balken in Abb. 8). Mittels der Acridin-Orange-Färbung (Meyer-Reil, 1983) wurde in beiden Proben mikroskopisch die



**Abb. 8** Sulfat-Reduktion in aufeinander folgenden Inkubationen derselben Sedimentprobe unter erhöhtem Methanpartialdruck. In rot sind die Inkubationsphasen markiert, bei denen eine Probe zur Zählung der Konsortien entnommen wurde.

Anzahl der Konsortien bestimmt. Vorherige Untersuchungen hatten gezeigt, dass die Konsortien mit der Acridin-Orange-Färbung anhand ihrer Form und Größe spezifisch zu erkennen sind. Die Konsortienzahl zu Beginn des Versuchs betrug  $5,5 \times 10^7 \text{ g}_{\text{dw}}^{-1}$ ; dies ist geringfügig weniger als für den aktivsten Sedimenthorizont des Hydratrückens beschrieben wurde ( $9 \times 10^7 \text{ g}_{\text{dw}}^{-1}$ , Boetius *et al.*, 2000). Die Anzahl der Konsortien stieg in dem Zeitraum des Versuchs um den Faktor 10,5 auf  $5,7 \times 10^8 \text{ g}_{\text{dw}}^{-1}$  an (Abb. 9). Der höhere Methanpartialdruck führt zu einer höheren Methankonzentration, die dadurch erhöhte Umsatzrate des Methans führt vermutlich auch zu schnellerem Wachstum. Ein weiterer Aspekt ist die Steigerung der freien Energie von  $-23,6$  auf  $-35 \text{ kJ/mol}$ , wenn sich der Methanpartialdruck von  $0,1$  auf  $1,37 \text{ MPa}$  erhöht. Dies ermöglicht den Organismen einen gesteigerten Wachstumsertrag. Da es sich um geschlossene Systeme handelt, wird die verfügbare Energie umso geringer, je mehr Substrat umgesetzt wird. Nach der Oxidation von  $10 \text{ mmol}$  Methan liefert der Prozess nur noch  $-27,3 \text{ kJ/mol}$ . Unter den konstanten



**Abb. 9** Die Anzahl der Konsortien im Verlauf der Inkubation unter erhöhtem Methanpartialdruck, differenziert nach Größenklassen.

Bedingungen *in situ* stehen den Organismen dagegen immer etwa  $-40 \text{ kJ/mol}$  zur Verfügung; ihre Wachstumsrate ist daher vermutlich höher als in den Druckinkubationen.

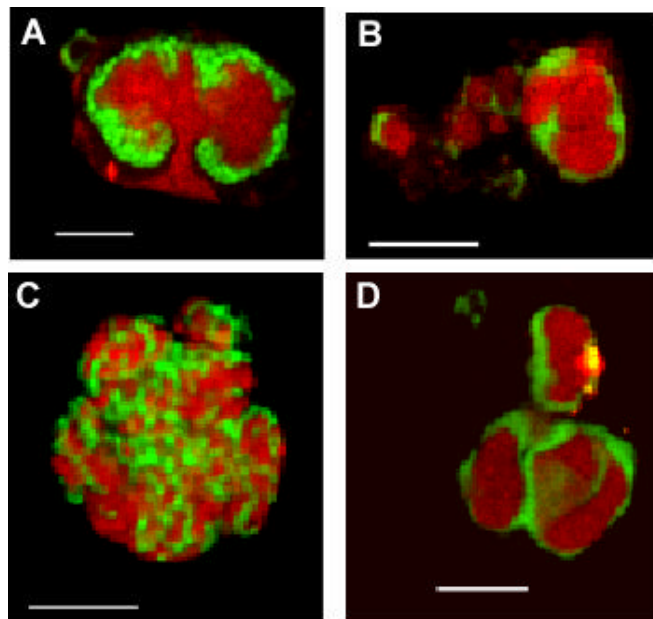
Mit dem Ziel sedimentfreie Anreicherungen oder gar eine Reinkultur zu erhalten, wurde zur Erhöhung der Konsortienzahl pro Sedimentvolumen nach jeder zehnten Inkubationsphase die Hälfte des Sediments in neues Medium überführt. In diesen verdünnten Proben war die Sulfat-Reduktionsrate mit Methan als Elektronendonator noch höher: Im neunten und bisher letzten Transfer betrug sie  $9,5 \text{ mmol d}^{-1} \text{ g}_{\text{dw}}^{-1}$ . Um die Ergebnisse der Zählungen zu unterstützen, wurde die relative Zunahme der Konsortien an der gesamten Biomasse noch mit anderen Methoden nachgewiesen. So wurden Analysen verschiedener 16S rRNA Gensequenzen (PCR/DGGE) vorgenommen und die Biomarker analysiert (von Marcus Elvert). Trotz mehrfacher Durchführung der PCR/DGGE wurden keine deutlichen Ergebnisse erzielt. Die Banden in der DGGE waren schwach und durch Hintergrund überlagert, ausgeschnittene Banden lieferten keine auswertbaren Sequenzen. Das Biomarkerprofil hingegen zeigte eine deutliche Veränderung gegenüber dem

ursprünglichen Sediment vom Hydratücken. Das Gesamtmuster vereinfachte sich, und solche Substanzen, die mit der anaeroben Oxidation von Methan in Verbindung gebracht werden, nahmen teilweise zu. Besonders auffällig war die Zunahme der ungesättigten Fettsäuren C16:1 $\omega$ 5c (cis-Hexadecansäure) und cyC17:1 $\omega$ 5,6 (11,12-Methylenhexadecansäure), die für Sulfat-Reduzierer charakteristisch sind (Elvert *et al.*, 2003). Sie zeigten im ursprünglichen Sediment den niedrigsten  $\delta^{13}\text{C}$ -Wert. Diejenigen Sulfat-Reduzierer, die *in situ* ihre Biomasse aus dem isotopisch leichten Methankohlenstoff aufbauen, sind demnach dieselben, die in den hier durchgeführten Anreicherungen wuchsen. Auch das für anaerob Methan oxidierende Archaeen typische ungesättigte *sn*-2-Hydroxyarchaeol (Elvert *et al.*, 2001) nahm in den Anreicherungen zu.

Im Gegensatz zu anderen Konsortien, wie zum Beispiel phototrophen Pelochromatien (Overmann *et al.*, 1998), die eine recht einheitliche Form und Größe haben, kamen die hier untersuchten Konsortien in unterschiedlichen Größen vor. Die Zählungen wurden daher nach fünf Größenklassen differenziert durchgeführt (Durchmesser <6  $\mu\text{m}$ , 6  $\mu\text{m}$ , 12  $\mu\text{m}$ , 18  $\mu\text{m}$ ,  $\geq 25 \mu\text{m}$ ; Zählungen von Melanie Albrecht). Die kleinsten Konsortien stellten immer den größten Anteil. Die Anzahl der Konsortien aller Größen stieg kontinuierlich an (Abb. 9), mit einer durchschnittlichen Verdopplungszeit von 4,7 Monaten. Der Anstieg der Anzahl der größten Konsortien viel am stärksten aus, sie hatten eine Verdopplungszeit von nur 2,3 Monaten. Diese letzte Größenklasse wurde nicht weiter unterteilt, obwohl auch Konsortien mit einem Durchmesser von bis zu 100  $\mu\text{m}$  vorkamen.

Noch ist unklar, auf welche Art und Weise die Konsortien wachsen, wie sie entstehen und wie groß sie werden können. In großen dicht gepackten Konsortien aus sehr vielen Zellen kann eine ausreichende Versorgung aller Zellen aufgrund von Diffusion nicht mehr gewährleistet sein (Boone *et al.*, 1989). Es muss also eine obere Grenze der Größe geben, bis zu der eine ausreichende Substratversorgung noch gegeben ist. Ein Hinweis darauf sind die im Verlauf des Experimentes mit zunehmender Häufigkeit beobachteten großen, geplatzten Konsortien, die viele Einzelzellen freisetzen, sowohl von Archaeen als auch von Sulfat-Reduzierern. Diese könnten wieder Ausgangspunkt für neue kleine Konsortien sein. Außerdem wurde beobachtet, dass die SRB in den inneren aus Archaeen bestehenden Teil hineinwachsen und so das Konsortium gleichmäßig teilen (Abb. 10A).





**Abb. 10** Konsortien, die mit spezifischen Sonden für ANME-2a/-2c (Sonde ANME647 und 622; rot) und Sulfat-Reduzierer (DSS658; grün) hybridisieren. Die Balken entsprechen 10  $\mu\text{m}$ . (A) Sulfat-Reduzierer, die in den zentralen Bereich der Archaeen hineinwachsen; (B) kleine Konsortien, die sich von größeren ablösen; (C) typisches durchmischtes Konsortium mit ANME-2a; (D) typische Konsortien mit Schalenstruktur, ANME-2c.

Auch die Ablösung kleiner Konsortien von größeren wurde beobachtet (Abb. 10B). Durch Hybridisierungen mit spezifischen Sonden konnte bestätigt werden, dass es sich in den Anreicherungen tatsächlich um die gleiche Gruppe von Konsortien handelte, wie sie *in situ* vorkommen (Boetius *et al.*, 2000).

Neuere Befunde zeigten, dass es sich bei den am Hydratrücken vorkommenden Konsortien um zwei phylogenetisch unterschiedliche Typen handelt, bei denen die archaeellen Partner zu unterschiedlichen Untergruppen gehören (ANME-2a und -2c; Knittel pers. Mitteilung). Auch bezüglich der Anordnung der Archaeen und der SRB unterscheiden sich die Konsortien. ANME-2a bildet Konsortien, in denen beide Zelltypen durchmischt sind. Bei ANME-2c dagegen entsteht die bisher bekannte „Schalenstruktur“, bei der die Sulfat-Reduzierer um einen zentralen Bereich aus Archaeen angeordnet sind (Boetius *et al.*, 2000). In einer hinsichtlich dieser Erkenntnisse durchgeführten Untersuchung konnte nachgewiesen werden, dass beide Konsortientypen auch in den Anreicherungen vorkommen (Abb. 10 C,D). Allerdings war die Differenzierung weniger eindeutig:

ANME-2a Konsortien mit „Schalenstruktur“ wurden ebenso vorgefunden wie durchmischte Konsortien mit Archaeen der ANME-2c Gruppe, wenn auch in geringerem Maße.

Neben den Konsortien befand sich eine Vielzahl weiterer Zellen in den Anreicherungen. Ein kleiner Teil der Archaeen konnte durch spezifische Sonden der ANME-1 Gruppe zugeordnet werden. Der Großteil der Archaeen und Bakterien wurde bisher jedoch nicht identifiziert. ANME-1 kommt am Hydratrücken in Oberflächensedimenten nur in geringeren Zellzahlen vor, erst unterhalb von fünf Zentimetern nimmt ihre Anzahl zu (Knittel pers. Mitteilung). In den mikrobiellen Matten des Schwarzen Meeres dagegen ist ANME-1 das dominante Archaeon (Michaelis *et al.*, 2002; Knittel pers. Mitteilung). Die vorgegebenen Medien und Inkubationsbedingungen scheinen also für die Anreicherung dreier phylogenetisch verschiedener anaerob Methan oxidierender Organismen (ANME-2a, ANME-2c, ANME-1) geeignet zu sein, die am natürlichen Standort in unterschiedlichen ökologischen Nischen vorkommen. (Die Daten dieses Abschnitts sind teilweise in Manuskript 4 enthalten).

#### **4.2. Wachstum anaerob methanotropher Organismen aus dem Schwarzen Meer**

In sechs aufeinander folgenden Inkubationsphasen bei erhöhtem Methanpartialdruck konnte in Proben aus dem Schwarzen Meer keine wesentliche Steigerung der von Methan abhängigen Sulfat-Reduktion festgestellt werden. Ein leichter Anstieg über die letzten vier Inkubationsphasen ist nicht als signifikant zu bewerten, da die Standardabweichungen der drei Parallelen hoch waren. Trotz der erfolgten Zerkleinerung der mikrobiellen Matten konnte eine ausreichende Homogenität der Proben vermutlich nicht erzielt werden. Eine stärkere Homogenisierung durch mechanische oder chemische Behandlung hätte die Aktivität der Proben womöglich beeinträchtigt.

Auch ohne Wachstum erfolgt bei stoffwechselaktiven Zellen eine gewisse Erneuerung von Zellbestandteilen. Daher war es möglich, die Inkorporation von  $^{13}\text{C}$ -Kohlenstoff aus Methan in Biomasse bereits nach drei Wochen nachzuweisen (Analysen von Richard Seifert). In vier aufeinanderfolgenden Inkubationsphasen konnte jeweils eine weitere  $^{13}\text{C}$ -Assimilation festgestellt werden. Auch die für die anaerobe Methanoxidation typischen Biomarker wie Archaeol, *sn*2-Hydroxyarchaeol und Crocetan bei Archaeen und spezielle iso- und antiso- $\text{C}_{15}$ -Fettsäuren bei SRB zeigten eine deutliche Zunahme von  $^{13}\text{C}$ .

Die Inkorporierung von  $^{13}\text{C}$  aus Methan in diese Biomoleküle verweist darauf, dass unter Laborbedingungen vermutlich die gleichen Organismen anaerob Methan oxidieren wie *in situ* (Michaelis *et al.* 2002). (Die Daten dieses Abschnitts wurden bisher nicht veröffentlicht).

#### **4.3. Isolierung von Sulfat-Reduzierern und Methanogenen aus Habitaten mit AOM**

In weiteren Experimenten wurde versucht, die beiden Partner aus dem Konsortium separat zu isolieren. Sowohl mit den Proben vom Hydratrücken als auch mit den mikrobiellen Matten aus dem Schwarzen Meer wurden Verdünnungsreihen in flüssigem Medium angesetzt. Als Substrate wurden unter anderem Lactat, Acetat, Methanol, Formiat,  $\text{H}_2/\text{CO}_2$  (mit und ohne 0,5 mmol/l Acetat), Methylamine (als Hydrochlorid) und ein Gemisch aus Fettsäuren (Propionat, Butyrat und Capronat) eingesetzt. Aus Sediment vom Hydratrücken wurden 15 Sulfat reduzierende Organismen und ein methanogener isoliert, aus den Matten vom Schwarzen Meer 18 Sulfat-Reduzierer und 10 Methanogene. Sowohl Sulfat-Reduzierer als auch Methanogene wurden nur auf den für sie jeweils typischen Substraten isoliert: die SRB auf Lactat,  $\text{H}_2/\text{CO}_2$ , Formiat und Acetat und die Methanogene auf Methanol,  $\text{H}_2/\text{CO}_2$ , Methylaminen und Acetat. Die Methanogenen von beiden Standorten wuchsen sehr viel langsamer als die Sulfat-Reduzierer.

Durch partielle Sequenzanalysen von 16S rRNA-Genen konnten die isolierten Stämme in 8 phylogenetische Gruppen unterteilt werden. Jeweils von einem Vertreter einer Gruppe wurde die vollständige Sequenz des 16S rRNA-Gens bestimmt. Der Vergleich mit 16S rRNA-Gen-Sequenzen der NCBI Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) zeigte die nächsten kultivierten Verwandten und ähnliche Sequenzen von Klonen bisher nicht kultivierter Organismen (Tabelle 1). Keiner der in dieser Arbeit isolierten Stämme war mit einem der für die AOM verantwortlichen Organismen verwandt. (Diese Daten sind teilweise in Manuskript 4 enthalten).

**Tabelle 1:** Sulfat reduzierende und methanogene Isolate aus dem Schwarzen Meer (BSS, BSM) und vom Hydratrücken (HRS, HRM) sowie ihre nächsten Verwandten

Represe ntative Isolate	Anzahl der Isolate	Nächster Verwandter Organismus/Klon	Ähnlichkeit (%)	Herkunft des nächsten Verwandten	Referenz
BSS-1; BSS-9; BSS-12	11	Nicht identifiziertes Bakterium	94	Gesteinsbohrlöcher	Pedersen <i>et al.</i> (1996)
BSS-7; HRS -10	6	<i>Desulfobacterium vacuolatum</i>	98	-	DSM3385 <sup>T</sup>
BSS-8; BSS-14	2	<i>Desulfobacter</i> sp. ASv25	96	Svalbard Sedimente	Knoblauch <i>et al.</i> 1999
BSS-15; HRS-8	3	Unkultivierter <i>Desulfobacula</i> Klon	97	Antarktische Sedimente	Purdy <i>et al.</i> (2002)
BSS-16; HRS-3	7	<i>Desulfofrigus fragile</i> sp. LSV21	98	Svalbard Sedimente	Knoblauch <i>et al.</i> (1999)
BSS-17	1	unkultiviertes Delta-Proteobakt. Sva 0999	97	Svalbard Sedimente	Ravenschlag <i>et al.</i> (1999)
BSM-1, BSM-7	5	<i>Methanococcoides burtonii</i>	98	ACE Lake, Antarktis	Franzmann <i>et al.</i> (1992)
BSM-11; HRM-1	3	unkultiviertes Archaeon	98	Guaymas Basin	Teske <i>et al.</i> (2002)

Die Schwierigkeit, die an einem Standort häufigen Organismen im Labor zu kultivieren, ist ein bekanntes Phänomen (Ward *et al.*, 1990; Giovannoni *et al.*, 1990). Die natürlichen Bedingungen, soweit sie überhaupt vollständig bekannt sind, lassen sich in geschlossenen Laborsystemen nur schwer reproduzieren (Caldwell *et al.*, 1997). Außerdem streben die meisten Kultivierungsansätze die Isolierung von Reinkulturen an, wobei Zell-Zell-Interaktionen außer Acht gelassen werden (Bruns *et al.*, 2002, 2003).

#### **4.4. Co-Kulturversuche**

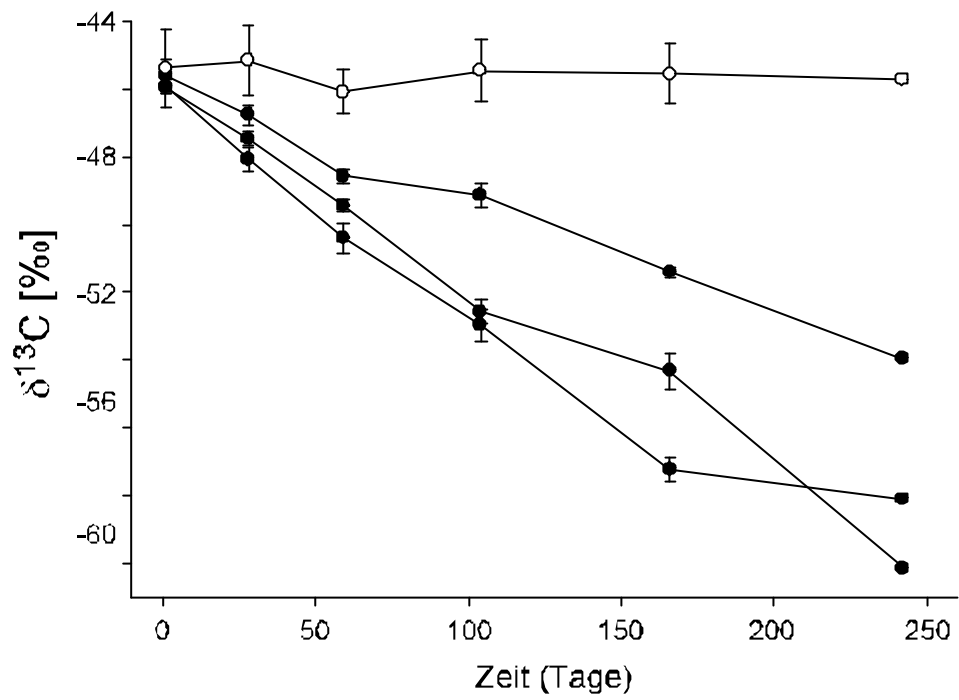
Obwohl die Isolate nicht mit den für AOM verantwortliche Organismen verwandt waren, wurde dennoch ihre Fähigkeit zur anaeroben Oxidation von Methan geprüft. Dazu wurden alle isolierten Sulfat reduzierenden Stämme eines Standortes gemeinsam mit allen isolierten methanogenen Stämmen desselben Standortes und Methan als einzigem potentiellen Elektronendonator inkubiert. Auch Ansätze in denen jede physiologische Gruppe allein vorlag wurden durchgeführt. Als Kontrolle wurden jeweils auch ohne Methan inkubiert. Eine von Methan abhängige Sulfat-Reduktion war jedoch in keinem der Ansätze nachweisbar. (Diese Daten sind teilweise in Manuskript 4 enthalten).

### **5. Kohlenstoff-Fraktionierung während der anaeroben Oxidation von Methan**

Der  $\delta^{13}\text{C}$ -Wert im Methan kann Aufschluss über dessen Herkunft geben (Whiticar, 1999). Neben der Differenzierung zwischen thermogen und mikrobiell entstandenem Methan (Schoell, 1988), läßt sich in Kombination mit den Isotopenverhältnissen des Wasserstoffs auch acetoklastische Methanogenese von der aus molekularem Wasserstoff und  $\text{CO}_2$  in natürlichen Habitaten unterscheiden (Whiticar *et al.*, 1986; Oremland *et al.*, 1987). Diese Differenzierung ist jedoch nur möglich, weil die Fraktionierungs-Faktoren der Methan bildenden Prozesse aus Laborversuchen bekannt sind. Beim Abbau von Methan ist bisher nur bekannt, dass die aerobe Oxidation ein stark fraktionierender Prozess ist, der zu hohen  $\delta^{13}\text{C}$ -Werten im restlichen Methan und zu niedrigen im entstehenden  $\text{CO}_2$  führt. Ohne Laborkulturen konnte die Fraktionierung der anaeroben Oxidation bisher nicht direkt untersucht werden. Da aber in anoxischen Habitaten auch hohe  $\delta^{13}\text{C}$ -Werte im Methan und niedrige im  $\text{CO}_2$  festgestellt wurden, wird davon ausgegangen, dass die anaerobe Oxidation

von Methan ähnlich fraktioniert wie die aerobe (Oremland & Des Marais, 1983; Alperin *et al.*, 1988).

Mit den mikrobiellen Matten aus dem Schwarzen Meer wurden erstmals Labor-experimente zur Kohlenstoff-Fraktionierung bei der AOM durchgeführt. In Inkubationen mit einer Gasphase, die etwa 70% Methan enthielt, wurde die isotopische Zusammensetzung des verbleibenden Methans während der Oxidation bestimmt. Der  $\delta^{13}\text{C}$ -Wert des Methans nahm während der Inkubation von  $-46$  auf  $-59$  ständig zu (Abb. 11; die Bestimmung der Isotopenwerte wurde von Richard Seifert durchgeführt). Es scheint somit, als würde  $^{13}\text{C}$ -Methan bevorzugt oxidiert. Allerdings ist kein biologischer Prozess bekannt, der zugunsten eines schwereren C-Isotops diskriminiert. In methanfreien Inkubationen, ohne eine Zugabe von Substraten wurde eine geringe Methanogenese festgestellt; deren Rate betrug etwa 10% der Methan-Oxidationsrate. Das produzierte Methan war isotopisch leicht ( $\delta^{13}\text{C}$ -Wert =  $-60$  bis  $-90\text{‰}$ ). Berechnungen ergaben, dass eine 10%ige Beimischung leichten Methans zu den gemessenen Isotopenwerten führen könnte. Auch ähnliche Verhältnisse in natürlichen Habitaten wurden auf diese Weise erklärt (Alperin *et al.*, 1988). Zur Bestimmung des Fraktionierungs-Faktors der AOM sind daher Versuche mit Reinkulturen oder Anreicherungen ohne Hintergrundaktivität von Methanogenese notwendig. (Die Daten dieses Abschnitts wurden bisher nicht veröffentlicht).



**Abb. 11**  $\delta^{13}\text{C}$ -Werte des verbleibenden Methans während der AOM in Proben aus dem Schwarzen Meer. Es sind drei Replikate und eine Kontrolle mit Methan, aber ohne mikrobielle Matte dargestellt (dreifach Messungen  $\pm$  sd).

## 6. Ausblick

Die bisherigen mikrobiologischen Untersuchungen zur Isolierung der für die AOM verantwortlichen Organismen, zur Aufklärung des Prozesses und zur genauen Regulation durch den Methanpartialdruck sollten in folgender Weise weiter geführt werden:

Zur Aufklärung der Kinetik der anaeroben Oxidation von Methan muss besonderes Augenmerk auf einen erhöhten Methanpartialdruck gelegt werden. Die Ermittlung der Sättigungskonzentration würde Aufschluss darüber geben, inwieweit die Organismen am natürlichen Standort in der Lage sind, auf erhöhte Methankonzentrationen zu reagieren, wie sie beispielsweise bei einer verstärkten Dissoziation von Gashydraten in Folge globaler Erwärmung auftreten könnte. Die Technik der Druckinkubation unter erhöhtem Methanpartialdruck müsste dazu weiter entwickelt werden.

Um die noch nicht abschließend und eindeutig geklärte Frage zu beantworten, ob es sich bei der AOM um eine Syntrophie handelt, oder ob ein Organismus in der Lage ist, den Prozess zu katalysieren, ist eine Isolierung der verantwortlichen Organismen notwendig. Die in dieser Arbeit begonnene Anreicherung anaerob Methan oxidierender Konsortien unter erhöhtem Methanpartialdruck bietet hierfür vielversprechendes Ausgangsmaterial.

Um darüber hinaus auch ANME-1 Organismen anzureichern, sollte die in dieser Arbeit entwickelte Methode der Druckanreicherung mit weiteren Proben durchgeführt werden. Eventuell könnte es so auch gelingen, im Labor nur aus Archaeen bestehende anaerob Methan oxidierende Kulturen anzureichern, wie sie in natürlichen Proben mit AOM bereits festgestellt wurden (Lösekann, 2002; Knittel *et al.*, 2003).

Auch zur Ermittlung der Kohlenstoff-Fraktionierungs-Faktoren sind Reinkulturen oder hoch angereicherte Kulturen notwendig.

Es zeigt sich, dass für die Beantwortung der in dieser Arbeit noch nicht abschließend geklärten Fragestellungen die Isolierung einer Reinkultur anaerob Methan oxidierender Mikroorganismen die zentrale Voraussetzung ist.



## C Literaturverzeichnis

- Ahron, P.; Fu, B. (2000) Microbial sulfate reduction rates and sulfur and oxygen isotope fractionations at oil and gas seeps in deepwater Gulf of Mexico. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **64**: 233-246.
- Alperin, M.J. & Reeburgh, W.S. (1985) Inhibition Experiments on anaerobic methane oxidation. *Applied and Environmental Microbiology* **50**: 940-945.
- Alperin, M.J.; Reeburgh, W.S.; Whiticar, M.J. (1988) Carbon and hydrogen isotope fractionation resulting from anaerobic methane oxidation. *Global Biogeochemical Cycles* **2**: 279-288.
- Amann, R.I.; Ludwig, W.; Schleifer, K.-H. (1995) Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Reviews* **59**: 143-169.
- Amann, R.; Snaidr, J.; Wagner, M.; Ludwig, W.; Schleifer, K.-H. (1996) *In situ* visualization of high genetic diversity in a natural microbial community. *Journal of Bacteriology* **178**: 3496-3500.
- Anthony, C. (1986) Bacterial oxidation of methane and methanol. *Advances in Microbial Physiology* **27**: 113-210.
- Balch, W.E.; Fox, G.E.; Magrum, L.J.; Woese, C.R.; Wolfe, R.S. (1979) Methanogens: Reevaluation of a unique biological group. *Microbiological Reviews* **43**: 260-296.
- Barnes, R.O. und Goldberg, E.D (1976) Methane consumption in anoxic marine sediments. *Geology* **2**: 297-300.
- Boetius, A.; Ravensschlag, K.; Schubert, C.; Rickert, D.; Widdel, F. *et al.* (2000) A marine microbial consortium apparently mediating anaerobic oxidation of methane. *Nature* **407**: 623-626.
- Boetius, A. & Suess, E. (2003) Hydrate Ridge: a natural laboratory for the study of microbial life fueled by methane from near-surface gas hydrates. (akzeptiert)
- Boone, D.R.; Johnson, R.L.; Lui, Y. (1989) Diffusion of the interspecies electron carriers H<sub>2</sub> and formate in methanogenic ecosystems and its implications in the measurement of K<sub>m</sub> for H<sub>2</sub> or formate uptake. *Applied and Environmental Microbiology* **55**: 1735-1741.

- Bowman, J. (2003) The methanotrophs – The families Methylococceae and Methylocystaceae. M. Dworkin *et al.* (eds.) In *The Prokaryotes: An Evolving Electronic Resource for the Microbiological Community*, 3rd edition, release 3.7, November 2, 2001, Springer-Verlag, New York, <http://link.springer-ny.com/link/service/books/10125/>.
- Bréas, O.; Guillou, C.; Reniero, F.; Wada, E. (2001) The global methane cycle: isotopes and mixing ratios, sources and sinks. *Isotopes and Environmental Health studies* **37**: 257-379.
- Bruns, A.; Cypionka, H.; Overmann, J. (2002) Cyclic AMP and acyl homoserin lactones increase the cultivation efficiency of heterotrophic bacteria from the central Baltic Sea. *Applied and Environmental Microbiology* **68**: 3978-3987.
- Bruns, A.; Nübel, U.; Cypionka, H.; Overmann, J. (2003) Effects of signal compounds and incubation conditions on the culturability of freshwater bacterioplankton. *Applied and Environmental Microbiology* **69**: 1980-1989.
- Buffet, B.A. (2000) Clathrate hydrates. *Annual Reviews of Earth and Planetary Science* **28**: 477-507.
- Burns, S.J. (1998) Carbon isotopic evidence for coupled sulfate reduction-methane oxidation in Amazon Fan sediments. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **62**: 797-804.
- Bussman, I.; Dando, P.R.; Niven, S.J.; Suess, E. (1999) Groundwater seepage in the marine environment: role of mass flux and bacterial activity. *Marine Ecology Progress Series* **178**: 169-177.
- Caldwell, D.E.; Wolfaardt, G.M.; Korber, D.R.; Lawrence, J.R. (1997) Cultivation of microbial consortia and communities. pp: 79-90 Hurst, C.J.; Knudsen, G.R.; McInerney, M.J.; Stetzenbach, L.D.; Walter, M.V. (eds) In *Manual of Environmental Microbiology* ASM Press.
- Capone, D.G. und Kiene, R.P. (1988) Comparison of microbial dynamics in marine and freshwater sediments: contrasts in anaerobic carbon catabolism. *Limnology and Oceanography* **33**: 725-749.
- Cavanaugh, C.M.; Levering, P.R.; Maki, J.S.; Mitchell, R.; Lidstrom, M.E. (1987) Symbiosis of methylotrophic bacteria and deep-sea mussels. *Nature* **325**: 346-348.

- Chang, S.; Des Marais, D.; Mac, R.; Miller, S.L.; Strathearn, G.E. (1983) Prebiotic organic synthesis and origin of life. In J.W. Schopf (ed.) *Earth's Earliest Biosphere – its origin and Evolution*. Princeton University Press, Princeton, N.Y., pp. 99-139.
- Cicerone, R.J. und Oremland, R.S. (1988) Biogeochemical aspects of atmospheric methane. *Global Biogeochemical Cycles* **2**: 299-327.
- Coolen, M.J.L.; Cypionka, H.; Sass, A.M.; Sass, H.; Overmann, J. (2002) Ongoing modification of Mediterranean pleistocene sapropels mediated by prokaryotes. *Science* **269**: 2407-2410.
- Cord-Ruwisch, R. (1985) A quick method for the determination of dissolved and precipitated sulfides in cultures of sulfate-reducing bacteria. *Journal of Microbiological Methods* **4**: 33-36.
- Cord-Ruwisch, R.; Seitz, H.-J.; Conrad, R. (1988) The capacity of hydrogenotrophic anaerobic bacteria to compete for traces of hydrogen depends on the redox potential of the terminal electron acceptor. *Archives of Microbiology* **149**: 350-357.
- Crabtree, R.H. (1995) Aspects of methane chemistry. *Chemical Reviews* **95**: 987-1007.
- Crutzen, P.J. (1991) Methane's sinks and sources. *Nature* **350**: 380-381.
- Davis, J.B. & Yarbrough, H.F. (1966) Anaerobic oxidation of hydrocarbons by *Desulfovibrio desulfuricans*. *Chemical Geology* **1**: 137-144.
- Dawson, R. M. C.; Elliot, D. C.; Elliot, W. H.; Jones, K.M. (1986) Data for Biochemical Research. 3<sup>rd</sup> ed. Oxford Science Publications.
- Devol, A.H. (1983) Methane oxidation rates in the anaerobic sediments of Saanich Inlet. *Limnology and Oceanography* **28**: 738-742.
- Dianou, D. & Adachi, K. (1999) Characterization of methanotrophic bacteria isolated from a subtropical paddy field. *FEMS Microbiology Letters* **173**: 163-173.
- Dickens, G.R. (2001) The potential of oceanic methane hydrates with variable external conditions. *Organic Geochemistry* **32**: 1179-1193.
- Dickens, G.R. (2003) Rethinking the global carbon cycle with a large, dynamic and microbially mediated gas hydrate capacitor. *Earth and Planetary Science Letters* **213**: 169-183.
- Ehalt, D.H. (1974) The atmospheric cycle of methane. *Tellus* **26**: 58-70.

- Elvert, M.; Suess, E.; Whiticar, M.J. (1999) Anaerobic methane oxidation associated with marine gas hydrates: superlight C isotopes from saturated and unsaturated C<sub>20</sub> and C<sub>25</sub> irregular isoprenoids. *Naturwissenschaften* **86**: 295-300.
- Elvert, M.; Suess, E.; Greinert, J.; Whiticar, M.J. (2000) Archaea mediating anaerobic methane oxidation in deep-sea sediments at cold seeps of the eastern Aleutian subduction zone. *Organic Geochemistry* **31**: 1175-1187.
- Elvert, M.; Greinert, J.; Suess, E.; Whiticar, M.J. (2001) Carbon isotopes of biomarkers derived from methane-oxidizing microbes at Hydrate Ridge, Cascadia Convergent margin. In *Natural Gas Hydrates: Occurrence, Distribution, and Detection*. American Geophysical Union. Pp.: 115-129.
- Elvert, M.; Boetius, A.; Knittel, K.; Jørgensen, B.B. (2003) Characterization of specific membrane fatty acids as chemotaxonomic markers for sulfate-reducing bacteria involved in anaerobic oxidation of methane. *Geomicrobiology Journal*. (akzeptiert)
- Franzmann, P.D.; Springer, N.; Ludwig, W.; Conway de Macario, E.; Rohde, M. (1992) A methanogenic archaeon from Ace lake Antarctica: *Methanococcus burtonii* sp. nov. *Systematic and Applied Microbiology* **15**: 573-581.
- Fry, J.C. (1990) Direct methods and biomass estimation. In Grigorova, R. und Norris, J. R. (eds.) *Methods in Microbiology*, Academic Press, London, pp: 41-58.
- Giovannoni, S.J.; Britschgi, T.B.; Moyer, C.L.; Field, K.G. (1990) Genetic diversity in Sargasso Sea bacterioplankton. *Nature* **345**: 60-63.
- Girguis, P.R.; Orphan, V.J.; Hallam, S.J.; DeLong, E.F. (2003) Growth and methane oxidation rates of anaerobic methanotrophic Archaea in a continuous-flow bioreactor. *Applied and Environmental Microbiology* **69**: 5472-5482.
- Hallam, S.J.; Girguis, P.R.; Preston, C.M.; Richardson, P.M.; DeLong, E.F. (2003) Identification of methyl coenzyme M reductase A (*mcr A*) genes associated with methane-oxidizing Archaea. *Applied and Environmental Microbiology* **69**: 5483-5491.
- Hansen, L.B.; Finster, K.; Fossing, H.; Iversen, N. (1998) Anaerobic methane oxidation in sulfate depleted sediments: effects of sulfate and molybdate additions. *Aquatic Microbial Ecology* **14**: 195-204.

- Hanson, R.S.; Bratina, B.J.; Brusseau, G.A. (1993) Phylogeny and ecology of methylotrophic bacteria. pp. 285-302 Murrell, J.C. und Kelly, D.P. (eds.) In *Microbial Growth on C1 compounds*. Kluwer Academic Publishers.
- Hanson, R.S. & Hanson, T.E. (1996) Methanotrophic bacteria. *Microbiological Reviews* **60**: 439-471.
- Harder, J. (1997) Anaerobic methane oxidation by bacteria employing  $^{14}\text{C}$ -methane uncontaminated with  $^{14}\text{C}$ -carbon monoxide. *Marine Geology* **137**: 12-23.
- Harold, F.M. (1986) The vital force: A study of bioenergetics. W.H. Freeman and Company, New York.
- Hayes, J.M. (1993) Factors controlling  $^{13}\text{C}$  contents of sedimentary organic compounds: principles and evidence. *Marine Geology* **113**: 111-125.
- Hazeu, W. (1975) Some cultural and physiological aspects of methane-utilizing bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* **41**: 121-134.
- Hinrichs, K.-U.; Hayes, J.M.; Sylva, S.P.; Brewer, P.G.; DeLong, E.F. (1999) Methane-consuming archaeobacteria in marine sediments. *Nature* **398**: 802-805.
- Hinrichs, K.-U. & Boetius, A. (2002) The anaerobic oxidation of methane: new insights in microbial ecology and biogeochemistry. pp. 457-477. Wefer, G.; Billet, D.; Hebbeln, D.; Jørgensen, B.B.; Schlüter, M.; van Weering, T. (eds.) In: *Ocean Margin Systems* Springer Verlag Berlin-Heidelberg.
- Hinrichs, K.-U.; Hmelo, L.R.; Sylva, S.P. (2003) Molecular fossil record of elevated methane levels in late Pleistocene coastal waters. *Science* **299**: 1214-1217.
- Hoehler, T.M.; Alperin, M.J.; Albert, D.B.; Martens, C.S. (1994) Field and laboratory studies of methane oxidation in an anoxic marine sediment: evidence for a methanogen-sulfate reducer consortium. *Global Biogeochemical Cycles* **8**: 451-463.
- Hogan, K.B.; Hoffman, J.S.; Thompson, A.M. (1991) Methane on the greenhouse agenda. *Nature* **354**: 181-182.
- Iversen, N. & Blackburn, T.H. (1981) Seasonal rates of methane oxidation in anoxic marine sediments. *Applied and Environmental Microbiology* **41**: 1295-1300.
- Iversen, N. & Jørgensen, B.B. (1985) Anaerobic methane oxidation rates at the sulfate-methane transition in marine sediments from Kattegat and Skagerrak (Denmark). *Limnology and Oceanography* **30**: 944-955.

- Iversen, N.; Oremland, R.S.; Klug, M.J. (1987) Big Soda Lake (Nevada). 3. Pelagic methanogenesis and anaerobic methane oxidation. *Limnology and Oceanography* **32**: 804-814.
- Jackson, B.E. & McInerney, M.J. (2002) Anaerobic microbial metabolism can proceed close to thermodynamic limits. *Nature* **415**: 454-456.
- Jones, J.G. (1977) The effect of environmental factors on estimated viable and total populations of planktonic bacteria on lakes and experimental enclosures. *Freshwater Biology* **7**: 67-91.
- Karner, M. & Fuhrmann, J. (1997) Determination of active marine bacterioplankton: a comparison of universal 16S rRNA probes, autoradiography, and nucleic acid staining. *Applied and Environmental Microbiology* **63**: 1208-1213.
- Kelley, J.T.; Dickson, S.M.; Belknap, D.F.; Barnhardt, W.A.; Henderson, M. (1994) Giant sea-bed pockmarks – evidence for gas escape from Belfast Bay, Maine. *Geology* **22**: 59-62.
- King, G.M. (1992) Ecological Aspects of methane oxidation, a key determinant of global methane dynamics. *Advances in Microbial Ecology* **12**: 431-468.
- Klenk, H.-P.; Clayton, R.A.; Tomb, J.-F.; White, O.; Neelson, K.E. *et al.* (1997) The complete genome sequence of the hyperthermophilic, sulphate-reducing Archaeon *Archaeoglobus fulgidus*. *Nature* **390**: 364-370.
- Knoblauch, C; Sahm, K; Jørgensen, B.B. (1999) Psychrophilic sulfate-reducing bacteria isolated from permanently cold arctic marine sediments: description of *Desulfofrigus oceanense* gen. nov., sp. nov., *Desulfofrigus fragile* sp. nov., *Desulfofaba gelida* gen. nov., sp. nov., *Desulfotalea psychrophila* gen. nov., sp. nov., and *Desulfotalea arctica* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* **49**: 1631-1643.
- Kogure, K.; Simidu, U.; Taga, N. (1980) Distribution of viable marine bacteria in neritic seawater around Japan. *Canadian Journal of Microbiology* **26**: 318-323.
- Krüger, M.; Meyerdierks, A.; Glöckner, F.O.; Amann, R.; Widdel, F. *et al.* (2003) A conspicuous nickel protein in microbial mats that oxidize methane anaerobically. *Nature*. (akzeptiert)
- Kvenvolden, K.A. (1988) Methane-hydrate – a major reservoir of carbon in the shallow geosphere? *Chemical Geology* **71**: 41-51.

- Kvenvolden, K.A. (1993) Gas hydrates – Geological perspective and global change. *Geophysical Reviews* **31**: 173-183.
- Kvenvolden, K.A. (1995) A review of the geochemistry of methane in natural gas hydrate. *Organic Geochemistry* **23**: 997-1008.
- Kvenvolden, K.A. (1999) Potential effects of gas hydrate on human welfare. *Proceedings of the National Academy of Science, USA* **96**: 3420-3426.
- Lee, M.J. und Zinder, S.H. (1988) Hydrogen partial pressures in a thermophilic acetate oxidizing methanogenic coculture. *Applied and Environmental Microbiology* **54**: 1457-1461.
- Lein, A.; Ivanov, M.V.; Pimenov, N.V.; Gulín, M.B. (2002) Geochemical characteristics of the carbonate constructions formed during microbial oxidation of methane under anaerobic conditions. *Microbiology* **70**: 78-90.
- Lieleveld, J.; Crutzen, P.J.; Brühl, C. (1993) Climate effects of atmospheric methane. *Chemosphere* **26**: 739-768.
- Levin, L.A.; Michener, R.H. (2002) Isotopic evidence for chemosynthesis-based nutrition of macrobenthos: The lightness of being at Pacific methane seeps. *Limnology and Oceanography* **47**: 1336-1345.
- Lidstrom, M.E. (2003) The aerobic methylotrophic bacteria. M. Dworkin *et al.* (eds.) In *The Prokaryotes: An Evolving Electronic Resource for the Microbiological Community*, 3rd edition, release 3.7, November 2, 2001, Springer-Verlag, New York, <http://link.springer-ny.com/link/service/books/10125/>.
- Linke, P.; Suess, E.; Torres, M.; Martens, V.; Rugh, W.D. *et al.* (1994) *In situ* measurements of fluid flow from cold seeps at active continental margins. *Deep-Sea Research I* **41**: 721-739.
- Lösekan, T. (2002) Molekularbiologische Untersuchungen der Diversität und Struktur mikrobieller Lebensgemeinschaften in methanreichen, marinen Sedimenten (Håkon-Mosby-Schlammvulkan) Diplomarbeit an der Universität Bremen.
- Luff, R. & Wallmann, K. (2003) Fluid flow, methane flux, carbonate precipitation and biogeochemical turnover in gas hydrate-bearing sediments at Hydrate Ridge, Cascadia margin: Numerical modeling and mass balances. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **67**: 3403-3421.

- MacDonald, G.T. (1990) Role of methane clathrates in past and future climates. *Climatic Change* **16**: 247-281.
- Martens, C.S. & Berner, R.A. (1974) Methane production in the interstitial waters of sulfate-depleted marine sediments. *Science* **185**: 1167-1169.
- Merkx, M.; Kopp, D.A.; Sazinsky, M.H.; Blazyk, J.L.; Muller, J.; Lippart, S.J. (2001) Dioxygen activation and methane hydroxylation by soluble methane monooxygenase: a tale of two irons and three proteins. *Angewandte Chemie International Edition England* **40**: 2782-2802.
- Meyer-Reil, L. A. (1983) Benthic response to sedimentation events during autumn to spring at a shallow water station in the northwestern Kiel Bight. *Marine Biology* **77**: 247-256.
- Michaelis, W., Seifert, R.; Nauhaus, K.; Treude, T.; Thiel, V. *et al.* (2002) Microbial reefs in the Black Sea fueled by anaerobic oxidation of methane. *Science* **297**: 1013-1015.
- Mitchel, P (1961) Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature* **191**: 144-148.
- Myers, C.R. & Myers, J.M. (1992) Localization of cytochromes to the outer membrane of anaerobically grown *Shewanella putrefaciens* MR-1. *Journal of Bacteriology* **174**: 3429-3438.
- Nauhaus, K.; Boetius, A.; Krüger, M.; Widdel, F. (2002) *In vitro* demonstration of anaerobic oxidation of methane coupled to sulphate reduction in sediment from a marine gas hydrate area. *Environmental Microbiology*. **4**: 296-305.
- Niewöhner, C.; Hensen, C.; Kasten, S.; Zabel, M.; Schulz, H.D. (1998) Deep sulfate reduction completely mediated by anaerobic methane oxidation in sediments of the upwelling area off Namibia. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **62**: 455-464.
- Oremland, R.S. & Des Marais, D.J. (1983) Distribution and carbon isotopic composition of gaseous hydrocarbons in Big Soda Lake, Nevada: an alkaline, meromictic lake. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **47**: 2107-2114.
- Oremland, R.S.; Miller, L.G.; Whiticar, M.J. (1987) Sources and flux of natural gases from Mono-Lake, California. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **51**: 2915-2929.
- Oremland, R.S. & Capone, D.G. (1988) Use of "specific" inhibitors in biogeochemistry and microbial ecology. *Advances in Microbial Ecology* **10**: 285-383.



- Orphan, V.J.; House, C.H.; Hinrichs, K.-U.; McKeegan, K.D.; DeLong, E.F. (2001) Methane-consuming archaea revealed by directly coupled isotopic and phylogenetic analysis. *Science* **293**: 484-487.
- Orphan, V.J.; House, C.H.; Hinrichs, K.-U.; MaKeegan, K.D.; DeLond, E.F. (2002) Multiple archaeal groups mediate methane oxidation in anoxic cold seep sediments. *Proceedings of the National Academy of Science USA* **99**: 7663-7668.
- Overmann, J.; Tuschak, C.; Fröstl, J.; Sass, H. (1998) The ecological niche of the consortium “*Pelochromatium roseum*”. *Archives of Microbiology* **168**: 120-128.
- Pancost, R.D.; Damsté, J.S.S.; DeLint, S.; van der Maarel, M.J.E.C.; Gottschal, J.C. (2000) Biomarker evidence for widespread anaerobic methane oxidation in Mediterranean sediments by a consortium of methanogenic Archaea and bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **66**: 1126-1132.
- Panganiban Jr, A.T.; Patt, T.E.; Hart, W.; Hanson, R.S. (1979) Oxidation of methane in the absence of oxygen in lake water samples. *Applied and Environmental Microbiology* **37**: 303-309.
- Peckmann, J.; Reimer, A.; Luth, U.; Luth, C.; Hansen, B.T. *et al.* (2001) Methane-derived carbonates and authigenic pyrite from the northwestern Black Sea. *Marine Geology* **177**: 129-150.
- Pedersen, K.; Arlinger, J.; Ekendahl, S.; Hallbeck, L. (1996) 16S rRNA gen diversity of attached and unattached bacteria in boreholes along the access tunnel to the Äspö hard rock laboratory, Sweden. *FEMS Microbiology Ecology* **19**: 249-262.
- Pimenov, N.V.; Rusanov, I.I.; Poglazova, M.N.; Mityushina, L.L.; Sorokin, D.Y. *et al.* (1997) Bacterial mats on coral-like structures at methane seeps in the Black Sea. *Microbiology* **66**: 354-360.
- Pinhassi, J.; Zweifel, U.L.; Hagstrom, A. (1997) Dominant marine bacterioplankton species found among colony-forming bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **63**: 3359-3366.
- Postgate, J.R.; Hunter, J.R. (1964) Accelerated death of *Aerobacter aerogenes* starved in the presence of growth-limiting substrate. *Journal of General Microbiology* **34**: 459-473.

- Purdy, K. J.; Nedwell, D. B.; Embley, T.M. (2002) Analysis of the sulfate-reducing bacterial and methanogenic archaeal populations in contrastin Antarctic sediments. (nicht veröffentlicht).
- Rabus, R.; Hansen, T.A.; Widdel, F. (2003) Dissimilatory sulfate- and sulfur-reducing Prokaryotes. M. Dworkin *et al.* (eds.) In *The Prokaryotes: An Evolving Electronic Resource for the Microbiological Community*, 3rd edition, release 3.7, November 2, 2001, Springer-Verlag, New York, <http://link.springer-ny.com/link/service/books/10125/>.
- Ravenschlag, K.; Sahm, K.; Pernthaler, J.; Amann, R. (1999) High bacterial diversity in permanently cold marine sediments. *Applied and Environmental Microbiology* **65**: 3982-3989.
- Reeburgh, W.S. (1976) Methane consumption in Cariaco Trench waters and sediments. *Earth and Planetary Science Letters* **28**: 337-344.
- Reeburgh, W.S. (1980) Anaerobic methane oxidation: rate depth distributions in Skan Bay sediments. *Earth and Planetary Science Letters* **47**: 345-352.
- Reeburgh, W.S.; Whalen, S.C.; Alperin, M.J. (1993) The role of methylotrophy in the global methane budget. pp. 1-14. Murrell, J.C. und Kelly, D.P. (eds.) In: *Microbial Growth in C1 compounds*. Kluwer Academic Publishers.
- Reeburgh, W.S. (1996) "Soft spots" in the global methane budget. pp. 334-342. Lidstrom, M.E. und Tabita, F.R. (eds.). In *Microbial Growth on C1 Compounds*. Kluwer Academic Publishers.
- Ritz, K.; Griffiths, B.S.; Torsvik, V.L.; Hendriksen, N.B. (1997) Analysis of soil and bacterioplankton community DNA by melting profiles and reassociation kinetics. *FEMS Microbiology Letters* **149**: 151-156.
- Roszak, D.B. & Colwell, R.R. (1987) Survival strategies of bacteria in the natural environment. *Microbiological Reviews* **51**: 365-379.
- Rudd, J.W.M. & Taylor, C.D. (1980) Methane cycling in aquatic environments. *Advances in Aquatic Microbiology* **2**: 77-150.
- Sahling, H.; Rickert, D.; Lee, R.W.; Linke, P.; Suess, E. (2002) Macrofaunal community structure and sulfide flux at gas hydrate deposits from the Cascadia convergent margin, NE Pacific. *Marine Ecology Progress Series* **231**: 121-138.

- Schink, B. (1997) Energetics of syntrophic cooperation in methanogenic degradation. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **61**: 262-280.
- Schmaljohann, R. (1993) Mikrobiologische Aspekte von Fluid- und Gasaustritten. pp: 221-257 Meyer-Reil, L.S. und Köster, M. (eds.) In *Mikrobiologie des Meeresbodens* Gustav Fischer Verlag.
- Schmidt, T.M.; DeLong, E.F.; Pace, N.R. (1991) Analysis of a marine picoplankton community by 16S rRNA gene cloning and sequencing. *Journal of Bacteriology* **173**: 4371-4378.
- Schoell, M. (1988) Multiple origins of methane in the earth. *Chemical Geology* **71**: 1-10.
- Seeliger, S.; Cord-Ruwisch, R.; Schink, B. (1998) A periplasmic and extracellular c-type cytochrome of *Geobacter sulfurreducens* acts as a ferric iron reductase and as an electron carrier to other acceptors or to partner bacteria. *Journal of Bacteriology* **180**: 3686-3691.
- Simpson, I.J.; Blake, D.R.; Rowland, F.S.; Chen, T.Y. (2002) Implications of the recent fluctuations in the growth rate of tropospheric methane. *Geophysical Research Letters* **29**: 117-1 – 117-4.
- Sørensen, K.B.; Finster, K.; Ramsing, N.B. (2001) Thermodynamic and kinetic requirements in anaerobic methane oxidizing consortia exclude hydrogen, acetate and methanol as possible electron shuttles. *Microbial Ecology* **42**: 1-10.
- Söhngen, N.L. (1906) Über Bakterien, welche Methan als Kohlenstoffnahrung und Energiequelle gebrauchen. *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde und Infektionskrankheiten* **15**: 513-517.
- Sorokin, O.G.; Lein, A.Y.; Balanyuk, I.E. (2001) Thermodynamics of oceanic hydrothermal systems and abiogenic methane generation. *Oceanology* **41**:861-909.
- Sorokin, Y.I. (2002) The Black Sea – Ecology and Oceanography. In Martens, K. (series ed.) *Biology of Inland Waters*. Backhuys Publishers, Leiden.
- Steele, L.P.; Dlugokencky, E.J.; Lang, P.M.; Tans, P.P.; Martin, R.C.; Masarie, K.A. (1992) Slowing down of the global accumulation of atmospheric methane during the 1980's. *Nature* **358**: 313-316.
- Stock, D.; Leslie, A.G.W.; Walker, J.E. (1999) Molecular architecture of the rotary motor in ATP synthase. *Science* **286**: 1700-1705.

- Suess, E.; Torres, M.E.; Bohrmann, G.; Collier, R.W.; Greinert, J. *et al.* (1999) Gas hydrate destabilization: enhanced dewatering, benthic material turnover and large methane plumes at the Cascadia convergent margin. *Earth and Planetary Science Letters* **170**: 1-15.
- Teske, A.; Hinrichs, K.-U.; Edgcomb, V.; Gomez, A.D.V.; Kysela, D. *et al.* (2002) Microbial diversity of hydrothermal sediments in the Guyamas Basin: Evidence for anaerobic methanotrophic communities. *Applied and Environmental Microbiology* **68**: 1994-2007.
- Thiel, V.; Peckmann, J.; Seifert, R.; Wehrung, P.; Reitner, J.; Michaelis, W. (1999) Highly isotopically depleted isoprenoids: molecular markers for ancient methane venting. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **63**: 3959-3966.
- Thiel, V.; Peckmann, J.; Richnow, H.H.; Luth, U.; Reitner, J.; Michaelis, W. (2001) Molecular signals for anaerobic methane oxidation in Black Sea seep carbonates and a microbial mat. *Marine Chemistry* **73**: 97-112.
- Torres, M.E.; McManus, J.; Hammond, D.E.; deAngelis, M.A.; Heeschen, K.U. *et al.* (2002) Fluid and chemical fluxes in and out of sediments hosting methane hydrate deposits on Hydrate Ridge, OR, I: Hydrological provinces. *Earth and Planetary Science Letters* **201**: 525-540.
- Torsvik, V.; Øvras, L.; Thingstad, T.F. (2002) Prokaryotic diversity – magnitude, dynamics, and controlling factors. *Science* **296**: 1064-1066.
- Treude, T.; Boetius, A.; Knittel, K.; Wallmann, K.; Jørgensen, B.B. (2003) Anaerobic oxidation of methane above gas hydrates (Hydrate Ridge, OR). *Marine Ecology Progress Series* (eingereicht).
- Tryon, M.D.; Brown, K.M.; Torres, M.E. (2002) Fluid and chemical fluxes in and out of sediments hosting methane hydrate deposits on Hydrate Ridge, OR, II: Hydrological processes. *Earth and Planetary Science Letters* **201**: 541-557.
- Valentine, D.L. & Reeburgh, W.S. (2000) New perspectives on anaerobic methane oxidation. *Environmental Microbiology* **2**: 477-484.
- Valentine, D.L. (2000) Biogeochemistry of hydrogen and methane in anoxic environments: Thermodynamic and isotopic studies. Doktorarbeit in "Earth System Science" an der Universität von Kalifornien, Irvine, USA.

- Valentine, D.L.; Blanton, D.C.; Reeburgh, W.S. (2000) Hydrogen production by methanogens under low-hydrogen conditions. *Archives of Microbiology* **174**: 415-421.
- Ward, D.M.; Weller, R.; Bateson, M.M. (1990) 16S rRNA sequences reveal numerous uncultured microorganisms in a natural community. *Nature* **345**: 63-65.
- Wellsbury, P.; Goodman, K.; Cragg, B.A.; Parkes, R.J. (2000) 36. The geomicrobiology of deep marine sediments from Blake Ridge containing methane hydrates (site 994, 995, and 997). pp. 379-391 Paull, C.K.; Matsumoto, R.; Wallace, P.J.; Dillon, W.P. (eds.) *In Proceedings of the Ocean Drilling Program, Scientific Results*.
- Wellsbury, P. & Parkes, R.J. (2000) Deep Biosphere: Source of methane for oceanic hydrate, pp. 91-104. In: Max, E.D. (ed.). *Natural Gas Hydrate in Oceanic and Permafrost Environments*. Kluwer Academic Publishers.
- Whalen, S.C. & Reeburgh, W.S. (1990) Consumption of atmospheric methane by tundra soils. *Nature* **346**: 160-162.
- Whiticar, M.J.; Faber, E.; Schoell, M. (1986) Biogenic methane formation in marine and freshwater environments: CO<sub>2</sub> reduction vs. acetate fermentation – isotopic evidence. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **50**: 693-709.
- Whiticar, M.J. (1999) Carbon and hydrogen isotope systematics of bacterial formation and oxidation of methane. *Chemical Geology* **161**: 291-314.
- Whittenbury, R.; Phillips, K.C.; Wilkinson, J.F. (1970) Enrichment and isolation of methane-utilizing bacteria. *Journal of General Microbiology* **61**: 205-218.
- Widdel, F. & Bak, F. (1992) Gram-negative mesophilic sulfate-reducing bacteria. In *The Prokaryotes*. Balows, A.; Trüper, H.G.; Dworkin, M.; Harder, W.; Schleifer, K.-H. (eds.). New York: Springer, 3352–3378.
- Wieringa, E.B.A.; Overmann, J.; Cypionka, H. (2000) Detection of abundant sulphate-reducing bacteria in marine anoxic sediment layers by a combined cultivation and molecular approach. *Environmental Microbiology* **2**: 417-427.
- Woese, C.R. & Fox, G.E. (1977) Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proceedings of the National Academy of Science, USA* **74**: 5088-5090.

- Yamamoto, S.; Alcauskas, J.B.; Crozier, T.E. (1976) Solubility of methane in distilled water and seawater. *Journal of Chemical Engineering Data* **21**: 78-80.
- Zehnder, A.J.B.; Huser, B.; Brock, T.D. (1979) Measuring radioactive methane with the liquid scintillation counter. *Applied and Environmental Microbiology* **37**: 897-899.
- Zehnder, A.J.B. & Brock, T.D. (1980) Anaerobic methane oxidation: occurrence and ecology. *Applied and Environmental Microbiology* **39**: 194-204.
- Zinder, S.H. & Koch, M. (1984) Non-acetoclastic methanogenesis from acetate: acetate oxidation by a thermophilic syntrophic coculture. *Archives of Microbiology* **138**: 263-272.

## Teil II: Publikationen

### A Publikationsliste mit Erläuterungen

Diese Dissertation beruht im wesentlichen auf folgenden vier Publikationen. Vorangestellt sind kurze Erläuterungen über meine Beiträge an der jeweiligen Arbeit.

1 ***In vitro* demonstration of anaerobic oxidation of methane coupled to sulphate reduction in sediment from a marine gas hydrate area**

Katja Nauhaus, Antje Boetius, Martin Krüger, Friedrich Widdel

Das Konzept für diese Arbeit wurde von Friedrich Widdel entwickelt. Alle Experimente wurden von mir durchgeführt. Bei dem Versuch zu den potentiellen Intermediaten wirkte Martin Krüger mit. An der Erstellung des Manuskriptes habe ich redaktionell mitgewirkt.

2 **Microbial reefs in the Black Sea fueled by anaerobic oxidation of methane**

Walter Michaelis, Richard Seifert, Katja Nauhaus, Tina Treude, Volker Thiel, Martin Blumenberg, Katrin Knittel, Armin Gieseke, Katharina Peterknecht, Thomas Pape, Antje Boetius, Rudolf Amann, Bo Barker Jørgensen, Friedrich Widdel, Jörn Peckmann, Nikolai V., Pimenov, Maksim B. Gulin

Das Konzept für diese Arbeit wurde von Walter Michaelis, Richard Seifert, Katja Nauhaus, Tina Treude, Volker Thiel, Martin Blumenberg, Katrin Knittel, Armin Gieseke, Thomas Pape, Antje Boetius, Rudolf Amann, Bo Barker Jørgensen, Friedrich Widdel und Jörn Peckmann gemeinsam entwickelt. Die Proben für alle mikrobiologischen Versuche wurden von Tina Treude und mir auf dem FS *Professor Logachev* genommen. Die Langzeitinkubationen führte ich durch.

3 **Environmental regulation of anaerobic oxidation of methane mediated by ANME-I- and ANME-II- communities: a comparative analysis**

Katja Nauhaus, Tina Treude, Antje Boetius, Martin Krüger

Entwickelt wurde das Konzept von Martin Krüger und mir. Alle Versuche mit den Proben des Schwarzen Meeres führte ich durch. Ausserdem wurden folgende Versuche mit Proben vom Hydratrücken von mir durchgeführt, Untersuchungen zur Wirksamkeit von Antibiotika, Messungen der von Methan abhängigen Sulfat-Reduktion bei erhöhtem Methanpartialdruck sowie Bestimmung der Stöchiometrie, des Temperaturprofils und der Fähigkeit zur Disproportionierung. Bei der Erstellung des Manuskriptes unterstützten mich Antje Boetius und Martin Krüger.

4 ***In vitro* growth of anaerobic consortia of Archaea and sulfate-reducing-bacteria with methane as the sole electron donor**

Katja Nauhaus, Melanie Albrecht, Marcus Elvert, Antje Boetius

Das Konzept wurde von mir entwickelt, die mikrobiologischen Versuche führte ich durch. Die Zählungen der Konsortien erledigte Melanie Albrecht nach meiner Anleitung. Marcus Elvert führte die Analyse der Biomarker durch. Bei der Erstellung des Manuskriptes unterstützten mich Marcus Elvert und Antje Boetius.

**B Publikationen**



***In vitro* demonstration of anaerobic oxidation of methane  
coupled to sulphate reduction in sediment from a marine gas  
hydrate area**

Katja Nauhaus,<sup>1</sup> Antje Boetius,<sup>1,2,3</sup> Martin Krüger<sup>1</sup> and Friedrich Widdel<sup>1\*</sup>

Environmental Microbiology (2002) 4 (5): 296-305

---

<sup>1</sup>Max-Planck-Institut für Marine Mikrobiologie, Celsiusstrasse 1, D-28359 Bremen, Germany.

<sup>2</sup>Alfred-Wegener-Institut für Polar- und Meeresforschung, Am Handelshafen 12, D-27515 Bremerhaven, Germany.

<sup>3</sup>International University Bremen, Campusring 1, D-28759 Bremen, Germany

\*For correspondence. E-mail fwiddel@mpi-bremen.de; Tel. (+49) 421 2028 702; Fax (+49) 421 2028 790.

## Summary

Anaerobic oxidation of methane (AOM) and sulphate reduction were examined in sediment samples from a marine gas hydrate area (Hydrate Ridge, NE Pacific). The sediment contained high numbers of microbial consortia consisting of organisms that affiliate with methanogenic archaea and with sulphate-reducing bacteria. Sediment samples incubated under strictly anoxic conditions in defined mineral medium (salinity as in seawater) produced sulphide from sulphate if methane was added as the sole organic substrate. No sulphide production occurred in control experiments without methane. Methane-dependent sulphide production was fastest between 4°C and 16°C, the average rate with 0.1 MPa (approx. 1 atm) methane being 2.5 µmol sulphide per day and g dry mass of sediment. An increase of the methane pressure to 1.1 MPa (approx. 11 atm) resulted in a four to fivefold increase of the sulphide production rate. Quantitative measurements using a special anoxic incubation device without gas phase revealed continuous consumption of dissolved methane (from initially 3.2 to 0.7 mM) with simultaneous production of sulphide at a molar ratio of nearly 1:1. To test the response of the indigenous community to possible intermediates of AOM, molecular hydrogen, formate, acetate or methanol were added in the absence of methane; however, sulphide production from sulphate with any of these compounds was much slower than with methane. In the presence of methane, such additions neither stimulated nor inhibited sulphate reduction. Hence, the experiments did not provide evidence for one of these compounds acting as a free extracellular intermediate (intercellular shuttle) during AOM by the presently investigated consortia.

**Key words :** Methane, gas hydrate, anaerobic oxidation, sulphate reduction, stoichiometry

## Introduction

Methane can be used as electron donor and carbon source by microorganisms not only in the presence but also in the absence of oxygen. Utilisation of methane in the presence of oxygen is a well-established process in natural habitats as well as in pure cultures, and the involved genes and enzymes have been studied in detail (Bowman, 2000; Murrell *et al.*, 2000; Merckx *et al.*, 2001). In contrast, the oxidation of methane in the absence of oxygen is less understood. First evidence for an anaerobic oxidation of methane (AOM) came from geochemical in situ studies of marine sediments (Martens & Berner, 1974; Barnes & Goldberg, 1976; Reeburgh, 1976). These studies revealed that methane diffusing upwards from deep sites of sediments often disappears long before any contact with oxygen is possible. In such anoxic zones of sediments, sulphate is the only electron acceptor that can account for methane oxidation. The zone of AOM in depths profiles is usually evident from a concave-up curvature of the methane concentration coinciding with an increased sulphate reduction rate (Alperin & Reeburgh, 1985; Iversen & Jørgensen, 1985). In zones where biogenic methane with its naturally low  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  ratio disappears, isotopically light dissolved inorganic carbon and precipitated carbonates have been detected (Reeburgh, 1980; Ritger *et al.*, 1987; Paull *et al.*, 1992). This finding as well as the formation of radiolabelled  $\text{CO}_2$  upon injection of  $^{14}\text{C}$ -methane into anoxic marine sediments further provided evidence for AOM (Reeburgh, 1980; Iversen & Blackburn, 1981; Iversen & Jørgensen, 1985; Hansen *et al.*, 1998).

If radiolabelled methane was added to pure cultures of actively methane-producing archaea, a partial conversion to  $\text{CO}_2$  (without net consumption of methane) was observed (Zehnder & Brock, 1979; Harder, 1997). This suggested that reactions of methanogenesis are reversible to a certain extent, and that AOM may be catalysed by methanogens themselves if an electron sink is available. Hoehler *et al.* (1994) proposed that AOM is performed by archaea and sulphate-reducing bacteria (SRB) in a consortium where the former produce a free, extracellular intermediate that is scavenged by the latter. Molecular hydrogen has been most frequently supposed to function as such an intermediate. Further evidence for the existence of methane-oxidising consortia was provided by the finding of strongly  $^{13}\text{C}$ -depleted isoprenoid, presumably archaeal lipids and 16S rRNA gene sequences representing a distinct phylogenetic cluster related to the Methanosarcinales

(Elvert *et al.*, 1999; Hinrichs *et al.*, 1999; Pancost *et al.*, 2000; Hinrichs & Boetius, 2002). Microscopy of whole-cell hybridisation assays with 16S rRNA-targeted fluorescent probes revealed defined aggregates of archaeal and bacterial cells belonging to the Methanosarcinales and the Desulfosarcina-Desulfococcus branch of the  $\delta$ -Proteobacteria, respectively (Boetius *et al.*, 2000). Results of mass spectrometric ion microprobing of such aggregates were consistent with an assimilation of isotopically light carbon from methane (Orphan *et al.*, 2001). However, the postulated intermediate channelled between the partners is still unknown, and the functioning of H<sub>2</sub> as such an intermediate has been viewed critically (Boetius *et al.*, 2000; Spormann & Widdel, 2000; Valentine *et al.*, 2000; Sørensen *et al.*, 2001). Also, there are no cultivation-based approaches so far that may contribute to an understanding of the mechanism underlying AOM. Neither have pure or axenic binary cultures of methane-oxidising anaerobic organisms been established in the laboratory nor has net consumption of added methane with sulphate as electron acceptor been demonstrated in enrichment cultures or sediment slurries *in vitro*.

A main goal of the present study was to reveal a stoichiometric coupling between consumption of methane and reduction of sulphate as a process *in vitro* under strictly anoxic conditions. Samples from a marine methane hydrate area, the southern Hydrate Ridge (Cascadia convergent margin, NE Pacific) off the coast of Oregon appeared particularly suited for such experiments. Here, methane hydrates are located a few centimetres beneath the sediment surface at a water depth of 600-800 m, which corresponds to the hydrate stability limit in the cold (4-5 °C) bottom water (Suess *et al.*, 1999). Due to the juxtaposition of high concentrations of methane and sulphate (from seawater), the sediment in this area exhibits high rates of AOM and harbours dense populations of apparently methane-oxidising consortia (Boetius *et al.*, 2000). The present experiments reveal for the first time under laboratory conditions the process of sulphate reduction to sulphide with methane being consumed as the only electron donor. We also examined the effect of different incubation temperatures and partial pressures of methane on the sulphate reduction rate. Furthermore we addressed the question whether compounds known as substrates for methanogens may vice versa function as intermediates during AOM.

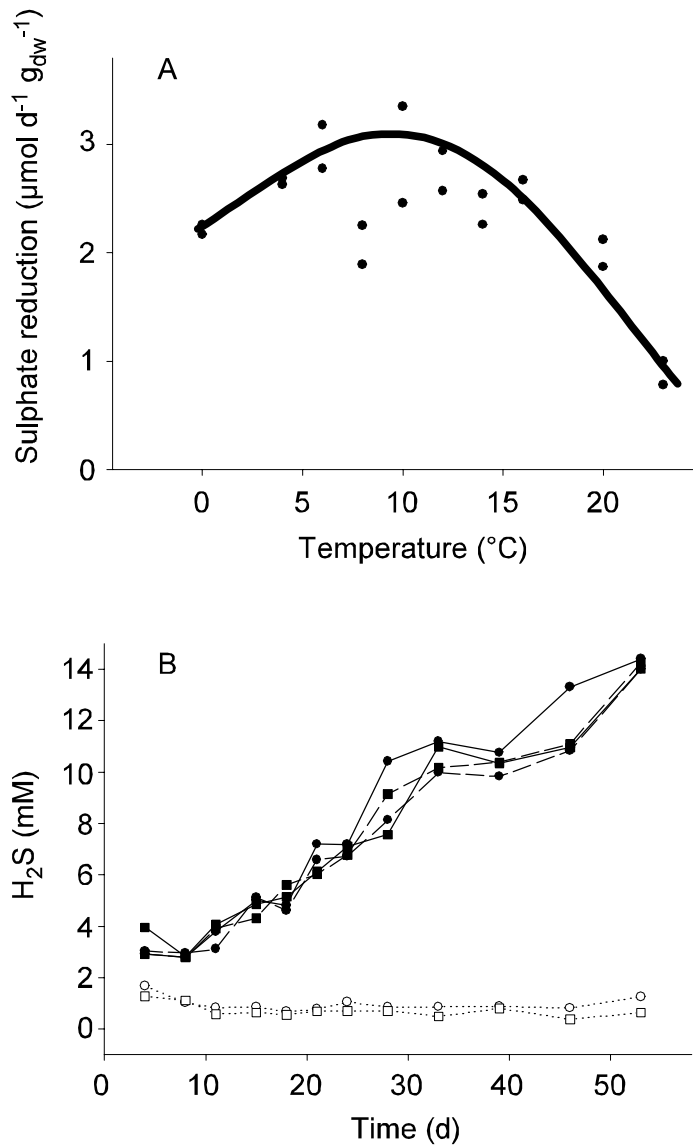
## Results

### *Microscopic examination of sediment samples*

Epifluorescence microscopy of sediment samples treated with 16S rRNA-targeted probes (designed for the Methanosarcinales and the *Desulfosarcina/Desulfococcus* cluster) revealed consortia at numbers that were similar as in previously taken samples from Hydrate Ridge sediment (Boetius *et al.*, 2000). Again, numbers were highest in the near-surface horizon of the sediment (1–4 cm); on the average,  $9 \times 10^7$  consortia per g dry mass of sediment were counted. The aggregates had an average diameter of 3  $\mu\text{m}$ . The ratio of the biovolumes occupied by the archaea and SRB in the aggregates was roughly 1:2. Both cell types were similar in size (diameter approx. 0.5  $\mu\text{m}$ ).

### *In vitro sulphate reduction with methane, and effect of temperature and of methane partial pressure*

Hydrate Ridge sediment samples taken near the surface (1–4 cm depth), where numbers of consortia were highest, were incubated at 12 °C in strictly anoxic natural seawater (pre-reduced with 0.5 mM sulphide) under an atmosphere of pure methane. The methane pressure was 0.1 MPa (approx. 1 atm) yielding a concentration in seawater of 1.4 mM (Yamamoto *et al.*, 1976). An average sulphate reduction rate of  $2.5 \pm 0.3$   $\mu\text{mol}$  per day and g dry mass of sediment was measured. Significant concentrations of sulphide were produced, often exceeding 8 mM after 50 days. No sulphide production was observed in controls incubated with dinitrogen instead of methane; in these, the sulphide concentration remained around 1 mM (concentration introduced with reductant and sediment slurry). The rates of methane-dependent sulphate reduction in sediment samples from the surface (0–1 cm) and from a deeper horizon (8–12 cm), that contained lower numbers of consortia, were 75 and 50%, respectively, of the rate measured in the most active horizon. The activity of methane-dependent sulphate reduction was not affected if the natural seawater was replaced by an artificial seawater medium. The latter was therefore used for all further experiments.



**Fig 1** Reduction of sulphate to sulphide with methane as electron donor in slurries of fresh sediment incubated under strictly anoxic conditions at various temperatures. **A** Rates of sulphate reduction (relative to sediment dry mass) at 10 different temperatures with a manually inserted trendline. Two replicates are shown for each temperature. **B** Examples of time-courses of sulphide production with methane. The experiments at 12 °C (●) and at 16 °C (■) from the series depicted in (A) are shown. Control incubations without methane addition are shown in respective open symbols.

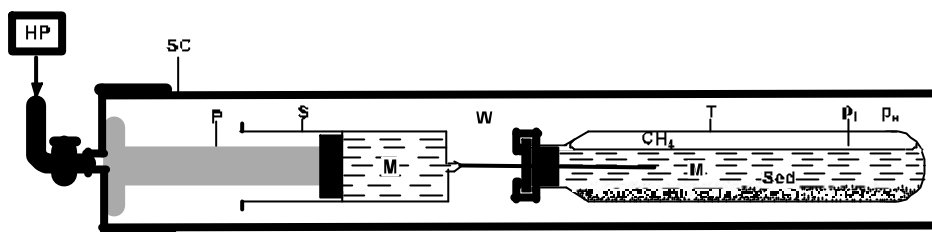
The observed reduction of sulphate to sulphide with methane as the only electron donor was studied in more detail in incubation experiments at various temperatures. The apparent optimum of methane-dependent sulphide production was between 4 and 16 °C (Fig 1A). Samples were also incubated at various methane partial pressures. To achieve

pressures above 0.1 MPa, a high-pressure incubation chamber was used (Fig. 2). Results show that an increase of the methane pressure clearly stimulated sulphate reduction (Fig. 3A). In all these experiments, the increase of the sulphide concentration over time was linear (Fig. 1B, 3B). Again, controls without methane did not show sulphide formation.

The capacity for sulphate reduction with methane became gradually weaker during storage of the original sediment in filled jars without methane (at 5 °C). After six months, only approx. 20% of the initially measured activity of methane-dependent sulphate reduction had remained in the stock of sampled sediment. Hence, incubation experiments started at different time with sub-samples yielded different rates of methane-dependent sulphide production. Variation in the sulphate reduction rate was also observed between batches of sediment from the same horizon, probably due to unequal horizontal distribution of consortia ("patchiness"). The parallels in every experiment presented here were, therefore, always carried out with sub-samples taken at the same time from the same batch of stored sediment.

#### *Stoichiometry of methane consumption during sulphate reduction*

Methane consumption and sulphide production from sulphate were simultaneously measured in a special incubation tube which allowed maintenance of dissolved methane concentrations above ambient-pressure saturation without any gas phase. Quantification of total methane was, therefore, possible without consideration of phase equilibrium or phase transfer. Fig. 4 shows that methane was consumed while sulphide was produced at almost the same rate; the rates of sulphide production and methane consumption were 1.7 and 1.5  $\mu\text{mol per d and g dry mass of sediment}$ , respectively. Five subsequent experiments yielded essentially the same results. Gravimetric sulphate determination at the end of the experiment revealed that 2.8 mM sulphate were consumed during production of 3.1 mM sulphide. Hence, sulphate consumption does account for methane-dependent sulphide formation.

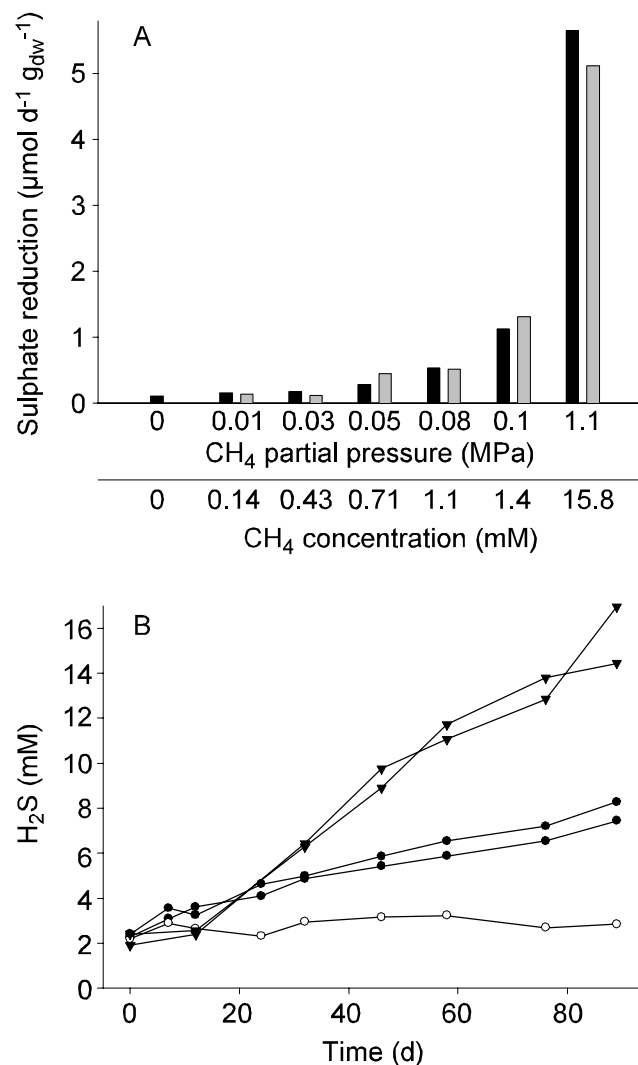


**Fig 2** Device for incubation of sediment (Sed) in seawater medium with methane of high partial pressure (high concentration). Slow increase of the surrounding water (W) pressure in the steel cylinder (SC) by means of a hydrostatic pump (HP) forces medium (M) from the syringe (S) by means of a piston (P) into the culture tube (T). The culture tube (total volume 20 ml) contains a methane headspace ( $\text{CH}_4$ ). The volume of the medium in the syringe is slightly larger (approximately 1.2-fold) than the initial gas volume in the tube. This set-up allows complete dissolution of the gas phase and avoids implosion of the tube because the inner pressure ( $p_i$ ) can equilibrate with any external hydrostatic pressure ( $p_e$ ) applied.

#### *Effect of exogenous potential electron donors other than methane*

Further experiments were carried out to examine whether typical substrates of methanogenic archaea are potential products of methane oxidation ("reverse methanogenesis") that are transferred to the SRB in the consortia. If the actual intermediate in AOM is artificially provided as an exogenous compound at high but non-inhibitory concentration in the absence of methane, the sulphate-reducing partner should immediately consume this compound as electron donor and form sulphide at least at the rate of AOM. As potential products of "reverse methanogenesis", we tested  $\text{H}_2$ , formate, acetate and methanol. With these compounds instead of methane, sulphide production during the first week was always slower than in samples incubated with methane (Fig. 5). If sediment was incubated with the indicated compounds in the presence of methane, sulphate reduction was neither slower nor faster than with methane alone. After incubation for more than two weeks, however, enrichment cultures of SRB with cells not resembling those in consortia developed with  $\text{H}_2$ , formate and acetate. The methane-free incubation tubes were in addition used to examine formation of methane. However, there was no evidence for a significant use of the added compounds for methanogenesis. Even though a certain increase of methane formation





**Fig 3** Formation of sulphide from sulphate with methane as electron donor in sediment slurries incubated under strictly anoxic conditions at various partial pressures of methane. Pressures below 1.1 MPa (1 atm, corresponding to 1.4 mM) of methane were applied using tubes with gasphases and different ratios of methane and nitrogen (see *Experimental procedures*) The high concentration (15.8 mM) at high pressure (1.1 MPa, or 11 atm) was achieved using the high pressure device depicted in Fig 2.

(A) Sulphate reduction rates (relative to sediment dry mass) at seven different concentrations of methane. A pair of a black and a grey bar indicates replicate incubations.

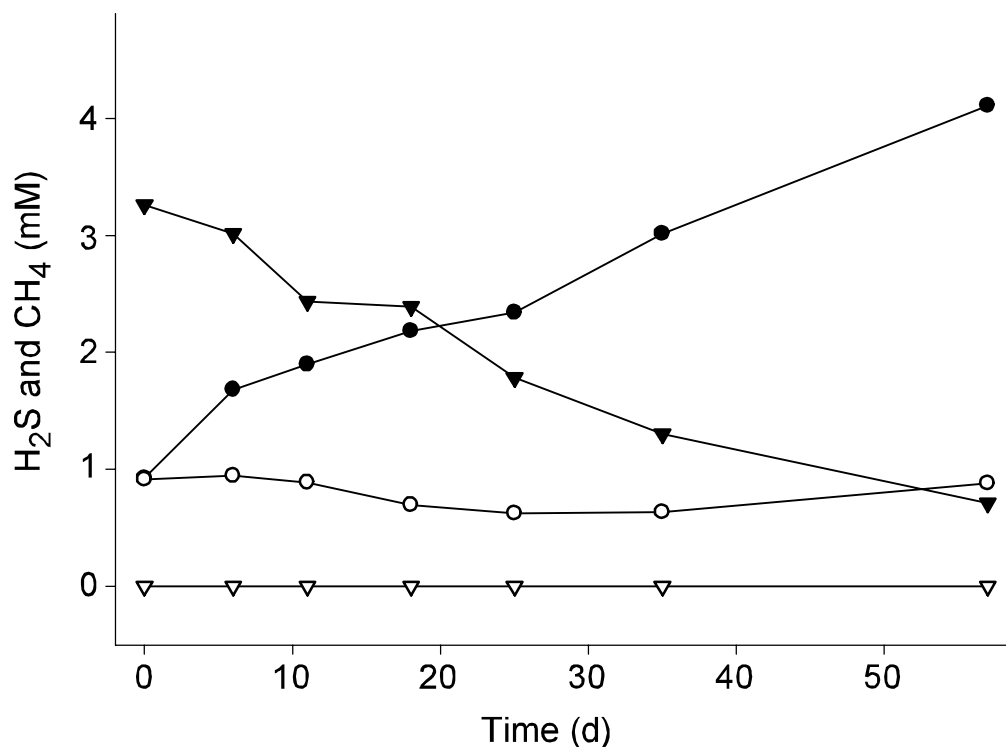
(B) Examples of time-courses of sulphide production with methane at different pressures. The experiments with 0.1 MPa (●) and at 1.1 MPa (▼) from the series depicted in (A) are shown. A control (○) did not contain methane. The slopes of sulphide production with the two methane pressures differ less than the corresponding rates in (A); this is due to the higher liquid volume in the experiment with 1.1 MPa methane, in which the tube was completely filled upon pressurization (see Fig 2).

above the background level (0.08  $\mu\text{mol}$  per d and g dry mass in controls without any addition) was observed, the rate of methanogenesis with the added compounds remained low ( $\leq 0.35$   $\mu\text{mol}$  per d and g dry mass) during the first two weeks of incubation. Only after three weeks, enrichment cultures of methanogens developed with methanol.

## Discussion

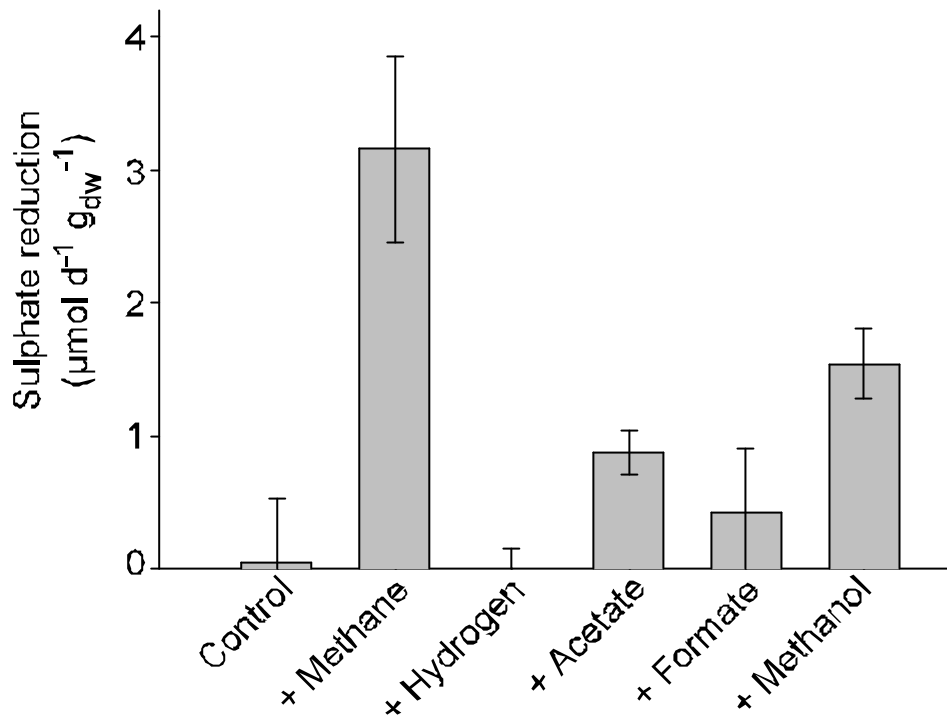
The present study reveals for the first time AOM with sulphate being reduced to sulphide as a stoichiometric process *in vitro*. The low optimum temperature range (4–16 °C) of the process (Fig. 1A) in the sediment suggests that at least one partner in the methane-oxidising consortium is psychrophilic. The relatively constant *in situ* temperature of 4–5 °C may have favoured the establishment of such cold-adapted consortia in the habitat. Obligately psychrophilic species are not rare among SRB, as recently shown with various isolates from Arctic sediment (Knoblauch *et al.*, 1999).

An increase of the methane partial pressure clearly stimulated the rate of sulphide production and hence the rate of AOM. Two factors, (i) the increased diffusive methane flux through the medium into the sediment and (ii) the physiological response of the consortia to the increased surrounding methane concentration, *viz.* their substrate utilisation kinetics, may account for this stimulation. Substrate utilization kinetics are of particular microbiological interest. However, the rates determined at various methane pressures always showed much scattering in plots used for linear displays of the Michaelis-Menten equation (Fersht, 1985); this may be due, for instance, to unequal distribution of consortia between tubes and an insufficiently defined actual methane concentration in the sediment in the used incubation devices. Still, the 4 to 5 fold stimulation of the sulphate reduction rate upon an increase of the methane pressure from 0.1 to 11 MPa gives a first hint at the kinetic behaviour of the consortia. Assuming that the methane concentrations in the sediment incubated under these two pressures were in the range of 1.3 to 1.4 and 14 to 16 mM, respectively (calculations given at the end of Experimental procedures), the significant stimulation of the sulphate reduction rate indicates that methane concentrations of some millimolar are still far below substrate saturation. This assumption contrasts  $K_M$  values (half-saturation constants) of AOM for methane in the range of 10  $\mu\text{M}$  or even lower than 10  $\mu\text{M}$  as assumed for other types of aquatic habitats (Smith *et al.*, 1991; and references therein; Iversen *et al.*, 1987). With, for instance, a  $K_M$  value of 50  $\mu\text{M}$ , the increase of the dissolved methane concentration with the pressure change from 0.1 to 11 MPa would stimulate the sulphate reduction rate by a factor of only 1.03–1.04. Provided the consortia exhibit Michaelis-Menten kinetics, a  $K_M$  value in the order of some millimolar has to be postulated to account for the presently observed stimulation (Fig. 3).



**Fig 4** Simultaneous consumption of methane (▼) and formation of sulphide (●) under strictly anoxic conditions at 12 °C. Respective open symbols represent measured concentrations of methane and sulphide in the control experiment without methane. The experiment was performed in a head space-free incubation device (modified from Alperin & Reeburgh, 1985; see text).

From the highest sulphate reduction rate measured in the present study (with 1.1 MPa methane approx. 5  $\mu$ mol per d and g dry mass) and the number of consortia in the sediment, a specific sulphate reduction rate of 20 mmol per day and g cell dry mass of SRB is calculated. This value is in the lower range of specific rates (15–430 mmol per d and g cell dry mass) observed with various pure cultures of SRB (Rabus *et al.*, 2000).



**Fig 5** Sulphate reduction rates (related to sediment dry mass; mean values  $\pm$  SD,  $n = 3$ ) in sediment samples incubated in medium with compounds known as typical methanogenesis substrates. Added concentrations: methane and hydrogen, 0.1 MPa (1 atm) in the head space; acetate, 10 mM; formate, 15 mM; methanol, 10 mM. The control was incubated without an added compound.

The consumption of methane and simultaneous formation of sulphide from sulphate at a molar ratio of approximately 1:1 (Fig. 4) is in accordance with the stoichiometric equation



This molar ratio as well as the lack of sulphide production in control experiments without methane shows that endogenous substrates other than methane are probably negligible as electron donors in the investigated sediment samples. Results are thus in accordance with in situ observations suggesting that sulphate reduction in the Hydrate Ridge sediment is fuelled only by methane (Boetius *et al.*, 2000). The measured molar ratio also shows that

the portion of methane that is channelled into the synthesis of cell carbon (approximately according to  $\text{CH}_4 + \text{CO}_2 \rightarrow 2 \langle \text{CH}_2\text{O} \rangle$ ) and not used for sulphate reduction is small and not quantifiable within the accuracy limits of the present measurements. Reliable quantification would require the measurement of cell mass or protein in sediment-depleted subcultures. Considering the relatively low energy gain from AOM (next paragraph), the growth yield (cell mass formed per amount of substrate oxidised) of the consortia may be even smaller than that of SRB growing on conventional substrates (lactate, acetate, etc.); in the latter, the portion of the assimilated substrate is usually approx. 10% of the portion that is oxidised (dissimilated) for energy conservation (Rabus *et al.*, 2000). Hence, the biomass produced during our incubations may have been marginal in comparison the biomass of consortia that was already present at the beginning of the experiments. Such an assumption would also offer an explanation for the linear increase of the sulphide concentration with methane as organic substrate (Fig. 1B, 3B). On the one hand, linear sulphide production has been also observed in growing cultures of SRB with repeated cell doubling (e.g., Rabus *et al.*, 1993).

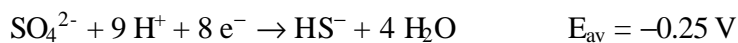
The free energy change of AOM according to eqn. 1 under standard conditions is  $\Delta G^\circ = -16.6 \text{ kJ mol}^{-1}$ . Under the conditions prevailing in the present experiments or in situ, free energy changes differ from the standard value. Temperature has only a minor influence on the  $\Delta G$ -value (at  $5^\circ\text{C}$ :  $\Delta G^\circ_{278\text{K}} = -16.2 \text{ kJ mol}^{-1}$ ), whereas the effect of temperature on thermodynamic equilibrium concentrations of intermediates can be more significant. For convenience, the free energies in the following are therefore calculated for  $25^\circ\text{C}$ . At the beginning of the experiment with the elevated methane pressure of 1.1 MPa (28 mM sulphate, 30 mM bicarbonate, and 1 mM sulphide), the free energy change was  $\Delta G = -37 \text{ kJ mol}^{-1}$ . The energetically least favourable conditions in this study were those at the end of experiments with 0.1 MPa (1 atm) methane (approx. pressure still present at the end), a decreased sulphate concentration of 10 mM, and an increased sulphide and bicarbonate concentration of 18 and 48 mM, respectively. The free energy change under such conditions is  $\Delta G = -20 \text{ kJ mol}^{-1}$ . The free energy gain from AOM in natural sediments is assumed to show even greater variation, due to the wide range of concentrations of reactants and products in gradients. A bioenergetically unfavourable situation is encountered in zones that exhibit almost complete methane consumption in the presence of low sulphate and high sulphide and bicarbonate concentrations. To our

knowledge, precise concentrations of all reactants and products for such zones have not been compiled. Still, AOM taking place, for instance, in the presence of 7kPa (0.07 atm, corresponding to 0.1 mM) CH<sub>4</sub>, 1 mM sulphate, 40 mM bicarbonate and 8 mM sulphide appears realistic in view of various depth profiles (e.g., Fossing *et al.*, 2000; Zabel & Schulz, 2001). The free energy change of AOM under such conditions would be only  $\Delta G = -10.6 \text{ kJ mol}^{-1}$ . Hence, the reaction can get rather close to the equilibrium, as has been also calculated for methanogenesis from organic acids in co-cultures (Jackson & McInerney, 2002). The low energy gain would even have to be shared between the partners in the consortia. It is still unclear whether and to which extent AOM under such conditions can be coupled to energy conservation and growth. On the other hand, AOM still taking place not too far from the thermodynamic equilibrium supports the hypothesis that methanogenesis (Thauer, 1998) is in principle reversible, despite of the high stability of the apolar C–H bond that accounts for the low reactivity of methane (Shilov & Shul'pin, 1997).

The type of intermediate shuttled between the methane-utilising archaea and the SRB is still unknown. One may envisage (i) a mere transfer of reducing equivalents and (ii) a transfer of an organic carbon compound directly derived from methane (Zehnder & Brock, 1979; Hoehler *et al.*, 1994; Boetius *et al.*, 2000; Spormann & Widdel, 2000; Sørensen *et al.*, 2001; Widdel & Rabus, 2001). Molecular hydrogen has been most frequently suggested to act as a shuttle in AOM. However, the concentration needed to render methane oxidation energetically feasible would have to be in the nanomolar range. This would be difficult to reconcile from a kinetic point of view with high methane oxidation rates as observed in Hydrate Ridge sediment (Boetius *et al.*, 2000; Spormann & Widdel, 2000). Similarly, a refined diffusion model for various hypothetical intermediates of AOM excluded molecular hydrogen as a shuttle because of insufficient concentration for the sulphate-reducing partner (Sørensen *et al.*, 2001). The model rather favoured formate as a possible intermediate since this can, in principle, reach higher concentrations than hydrogen as an intermediate. However, formate metabolism has not been observed in cultivated members of the Methanosarcinales to which the assumed methane-oxidising archaea belong. The concentration of acetate as an intermediate would have to be in the same range as that of molecular hydrogen. Concentrations of methanol or methylamines as intermediates would have to be orders of magnitude lower than those of molecular

hydrogen and acetate; such methyl compounds appear, therefore, even more unlikely as shuttles. In accordance with these considerations, the present experiments do not provide for molecular hydrogen, formate, acetate or methanol acting as a shuttle in the studied consortia.

Another possibility is the transfer of reducing equivalents via a carrier other than a typical methanogenic substrate. For any transfer of reducing equivalents, the formal half-reactions of AOM and their redox potentials (average of reduction steps at pH 7.5) under the conditions as described for the experiment with high methane pressure would be as follows:



With decreasing concentrations of methane and sulphate and increasing concentrations of sulphide and bicarbonate, the E values of the half-reactions approach each other. An electron shuttle in AOM with a midpoint potential in the range of these E values would be most favourable (Widdel & Rabus, 2001). From this point of view, the cofactor methanophenazine (estimated midpoint potential close to  $-0.255 \text{ V}$ ), which has been detected in *Methanosarcina* (Brodersen *et al.*, 1999), is one possible candidate that may be part of an electron transport chain in AOM. Possible electron shuttles other than molecular hydrogen in anaerobic co-cultures have been discussed elsewhere (Seeliger *et al.*, 1998; Schink & Stams, 2001). However, with any electron shuttle that is not based on a natural constituent of the surrounding seawater (like the  $2 \text{H}^+/\text{H}_2$  or  $\text{HCO}_3^-/\text{HCOO}^-$  system) but has to be synthesised like other cell components, diffusive loss and biodegradation by microorganisms in the environment would have to be prevented. A shuttle operating in direct physical contact between archaea and SRB, as it appears possible for peripheral cells in the consortia, would minimise this problem. This would require an association of the redox-active components with the cell surface, similar as postulated for iron-reducing (Myers and Myers, 1992) or iron-oxidising (Ehrenreich *et al.*, 1994; Appia-Ayme *et al.*, 1999) bacteria.



The transfer of an electron carrier rather than a methane-derived carbon compound in the consortia does not necessarily contradict the finding that  $^{13}\text{C}$ -depleted, methane-derived organic carbon occurs not only in the archaeal but also in the sulphate-reducing partner (Orphan *et al.*, 2001). Even though a transfer of a methane-derived intermediate offers the easiest explanation for this observation, one may alternatively envisage that the SRB grow autotrophically to a large extent using  $\text{CO}_2$  (Brysch *et al.*, 1987; Preuß *et al.*, 1989) from methane oxidation. At high methane turnover,  $\text{CO}_2$  formed and assimilated within the aggregates may not significantly equilibrate with isotopically "heavier" inorganic carbon from the surrounding water. Furthermore, also excreted or liberated organic by-products (exudates) from the archaea could, in principle, provide isotopically "light" precursors for biosynthetic reactions in the SRB.

Methane formation upon addition of molecular hydrogen, formate, acetate or methanol (without addition of methane) was by an order of magnitude lower than the rate of methane oxidation (corresponding to the rate of sulphate reduction) measured in the sediment. This suggests that the archaeal partners in the consortia do not represent usual methanogens that simply reverse methanogenesis if energetic conditions are in favour of AOM. Rather, one may speculate that the archaeal partners, which present a distinguished branch within the Methanosarcinales, are specialised microorganisms that grow preferentially (or even exclusively) by oxidation of methane.

## **Experimental procedures**

### *Origin and storage of sediment samples*

Sediment samples were taken during RV SONNE cruise SO-148/1 in August 2000 at the crest of the southern Hydrate Ridge (44°34' N, 125°09' W; 780 m water depth) in areas of active gas seeping using a video-guided multiple corer (Linke *et al.*, 2000). The cores were sliced into horizons from 0–1, 1–4 and 8–12 cm sediment depth. The sediment samples were anoxically stored in stoppered bottles (250 ml) without headspace at 5 °C until further processing in the laboratory.

### *Anoxic incubation experiments with methane*

All manipulations were done under an anoxic atmosphere of N<sub>2</sub> using either the Hungate technique and its modifications (Widdel & Bak, 1992; Breznak & Costilow, 1994) or an anoxic glove box (Mecaplex). The original sediment was mixed with approximately the same volume of anoxic seawater. In this way, a slurry with 0.2 to 0.3 g sediment dry mass per ml was obtained that could be transferred to tubes by means of plastic tubes (length, 150 mm; inner diameter, 5 mm) connected to a syringe (preflushed with nitrogen).

Sulphate reduction with methane at partial pressures of 0.1 MPa (1 atm) or less was measured in culture tubes (volume, approx. 20 ml; length, 135 mm; inner diameter, 14 mm) with a tapered, Viton rubber-sealed orifice (inner diameter, 9 mm). Tubes were provided with approx. 3 ml of sediment slurry and 9 ml of anoxic sea water (pre-reduced with 0.5 mM sulphide) or artificial sea water medium with ammonium (4 mM), phosphate (1 mM), trace elements, vitamins, bicarbonate (30 mM) and sulphide (0.5–1 mM) as used for cultivation of SRB (Widdel & Bak, 1992). The pH at the beginning of incubation was 7.4–7.5. In the initial experiments with anoxic seawater, pure methane of atmospheric pressure (0.1 MPa) was applied in the head space. In subsequent experiments with artificial seawater medium and methane of atmospheric pressure, an amount of CO<sub>2</sub> corresponding to 1/10 of the headspace volume was in addition injected by means of a syringe. A commercial N<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub>-mixture (90/10, [vol/vol]) was applied in controls. Lower methane partial pressures were achieved in tubes with the indicated N<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub>-mixture into which

defined volumes of methane were injected. Tubes were incubated horizontally to facilitate diffusion of methane into the sediment; they were gently shaken for a few seconds once per day. Tubes were not continuously shaken to avoid possible disintegration of microbial associations. Samples for chemical analyses were withdrawn during incubation via microliter syringes (preflushed with N<sub>2</sub>).

High partial pressures of methane were applied using a high-pressure incubation device (Fig. 2). An external hydrostatic pressure was transmitted via a syringe to the inside of a culture tube that contained sediment and artificial seawater medium (all sizes as described above) as well as a gas phase consisting of pure methane. The latter dissolved while further medium was forced into the tube. The tube was in horizontal position during incubation. Since measurement of time courses in one tube would be hampered by repeated compression and decompression, several of such tubes (each connected to a syringe) were incubated at high pressure. For each time point, one tube was taken out and allowed to decompress via the syringe piston at ambient pressure for 20 h. This avoided formation of gas bubbles in the microliter syringe when a defined liquid volume was withdrawn for sulphide determination.

The simultaneous determination of methane utilisation and sulphide production to investigate the stoichiometry of the process was carried out in an incubation experiment without gas phase. A relatively large gas phase of methane compared to the aqueous phase would not allow reliable measurement of methane consumption, particularly at the beginning of the experiment when the decrease in the total amount of methane was still relatively small. On the other hand, a small gas phase of methane would result in a slow supply of methane into the medium and sediment. Therefore, a special glass tube was used (modified from Alperin & Reeburgh, 1985) that allowed head space-free incubation of sediment samples with dissolved methane concentrations above the saturation limit given at ambient pressure. At one end, the glass tube (length, 180 mm; inner diameter, 17 mm) tapered towards a regular orifice (inner diameter, 9 mm) with a stopper (Viton rubber, fixed by screw cap with hole) that allowed withdrawal of aliquots with a syringe. At the other end, the tube tapered towards a smaller elongated glass tube (length, 65 mm; inner diameter, 9 mm) that harboured a gas-tight piston (silicon-lubricated Viton rubber); the piston was held in position by a screwing device. If a sample was withdrawn via the

opposite stopper, the piston was simultaneously pushed into the tube so as to avoid any underpressure and formation of gas bubbles. The high dissolved methane concentrations were achieved via an initial small (5 ml) head space in which 0.4 MPa (4 atm) of methane were kept for some hours under shaking. The gasphase was finally replaced by anoxic medium, and remaining bubbles were allowed to escape via an inserted hypodermic needle while the piston was slightly moved. This device, which was provided with 6 ml sediment slurry in a total volume of 40 ml, was incubated as the tubes described above.

### *Analyses*

The numbers and sizes of consortia in sediment were determined by microscopic examination using fluorescence techniques as described (Boetius *et al.*, 2000).

Sediment dry mass was determined after drying at 80 °C for 2 days.

Sulphide was determined colorimetrically using the methylene blue formation reaction in a miniaturised assay (Aeckersberg *et al.*, 1991) or the formation of colloidal copper sulphide (Cord-Ruwisch, 1985).

For the quantification of sulphate, 1.5 ml of a particle-free water sample was mixed with 0.1 ml of 2 M HCl. After heating in a boiling water bath, 0.4 ml of 0.5 M BaCl<sub>2</sub> solution was added. Precipitated BaSO<sub>4</sub> was quantitatively collected on a nitrocellulose filter (25 mm diameter, 0.2 µm pore size), washed with 10 ml distilled water, dried at 60 °C and quantified by weighing.

Methane was determined using a GC 14B gas chromatograph (Shimadzu) equipped with a Supel-Q Plot column (30 m × 0.53 mm; Supelco) and a flame ionisation detector. The carrier gas was N<sub>2</sub> at a flow rate of 3 ml min<sup>-1</sup>. The column temperature was 110 °C.

### *Calculations*

The specific sulphate reduction rate of the SRB in the consortia was calculated via their estimated cell dry mass. The latter was estimated from the average volume of the consortia by assuming densely packed cells with a dry mass content of 0.3 g cm<sup>-3</sup>, and occupation of 2/3 of the volume by SRB.

The geometry inside the inoculated tubes and their handling (occasional shaking) do not allow application of diffusion models to calculate the actual methane concentration in the sediment during incubation. Only rough estimation of a lower limit appears possible below which the methane concentration in the sediment was unlikely to drop. In the horizontally incubated culture tubes (section Anoxic incubation experiments with methane), the settled sediment formed a loose layer nearly over the whole length. The height of the liquid, which can be regarded as the approximate diffusion distance, was  $\Delta x = 0.8$  cm (maximum in the middle). The loose thin sediment layer is not expected to impede diffusion significantly. In the incubation experiment with various methane pressures (Fig. 3), application of 0.1 MPa (1 atm) methane resulted in an increase of the sulphide concentration in the medium of approx.  $0.07 \mu\text{mol cm}^{-3} \text{d}^{-1}$ , which is  $0.84 \mu\text{mol d}^{-1}$  for the culture volume (12 ml). With a surface area of the settled sediment of roughly  $8 \text{cm}^2$ , the flux of sulphide into the medium and hence the flux of methane into the sediment would be  $J = 0.105 \mu\text{mol cm}^{-2} \text{d}^{-1}$ . The diffusion coefficient for methane in seawater at  $12^\circ\text{C}$  is  $D = 0.86 \text{cm}^2 \text{d}^{-1}$  ( $1 \times 10^{-5} \text{cm}^2 \text{s}^{-1}$ ; Iversen & Jørgensen, 1985). Hence, the calculated flux would be associated with an approximate concentration difference between the sediment and the medium surface of  $-\Delta C = 0.1 \mu\text{mol cm}^{-3}$  (0.1 mM), according to Fick's first law of diffusion (for linear gradient,  $J = -D \Delta C / \Delta x$ ). The occasional shaking favoured the methane supply to the sediment. Hence, if the concentration of methane in the upper medium remains at 1.4 mM (dissolved methane upon addition of 0.1 MPa,  $12^\circ\text{C}$ ), the concentration in the sediment under the given conditions should not have been lower than 1.3 mM. A similar estimate for the experiment with 1.1 MPa (11 atm) methane (which was even completely dissolved at the beginning of incubation; Fig. 2) suggests that the actual methane concentration in the sediment was not lower than 14 mM.

If the rate  $v$  of sulphide production (and hence of methane oxidation) depends on the methane concentration  $C$  according to Michaelis-Menten kinetics, an increase of the concentration from  $C_1$  to  $C_2$  would result in an increase of the rate by a factor of  $v_2/v_1 = [C_2(K_M + C_1)]/[C_1(K_M + C_2)]$ .

Free energy changes ( $\Delta G$  values) under in situ or incubation conditions were calculated from  $G^\circ_f$  values via  $\Delta G^\circ$  values. For  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{HCO}_3^-$  and  $\text{HS}^-$  in seawater, activity coefficients of 0.1, 0.5 and 0.5, respectively, were estimated (Stumm & Morgan, 1996).

The influence of temperature on  $\Delta G^\circ$  was calculated via the integrated Gibbs-Helmholtz equation including the enthalpy ( $\Delta H^\circ$ ). Redox potentials of half-reactions (viewed as being in equilibrium) were calculated from  $\Delta G^\circ$  values via  $E^\circ$  values using concentrations and activity coefficients as for the calculation of  $\Delta G$ , and assuming a pH of 7.5.

## **Acknowledgements**

We thank the officers, crew and shipboard scientific party of RV SONNE for excellent support during expedition SO-148/1. We are indebted to Jens Harder for his help with gas chromatography and stimulating discussions. This study was made possible by the programs TECFLUX II (Tectonically induced Fluxes, FN 03G0148A) and MUMM (Mikrobielle Umsatzraten von Methan in gashydrathaltigen Sedimenten, FN 03G0554A) supported by the Bundesministerium für Bildung und Forschung (Germany). Further support was from the Max-Planck-Gesellschaft (Germany). This is publication GEOTECH-1 of the program GEOTECHNOLOGIEN of the BMBF and the DFG.

## References

- Aeckersberg, F.; Bak, F.; Widdel, F. (1991) Anaerobic oxidation of saturated hydrocarbons to CO<sub>2</sub> by a new type of sulfate-reducing bacterium. *Archives of Microbiology* **156**: 5–14.
- Alperin, M.J. & Reeburg, W.S. (1985) Inhibition experiments on anaerobic methane oxidation. *Applied and Environmental Microbiology* **50**: 940–945.
- Appia-Ayme, C.; Guilinai, N.; Ratouchniak, J.; Bonnefoy, V. (1999) Characterization of an operon encoding two c-type cytochromes, an aa<sub>3</sub>-type cytochrome oxidase, and rusticyanin in *Thiobacillus ferrooxidans* ATCC 33020. *Applied and Environmental Microbiology* **65**: 4781–4787.
- Barnes, R. & Goldberg, E. (1976) Methane production and consumption in anoxic marine sediments. *Geology* **2**: 297–300.
- Boetius, A.; Ravensschlag, K.; Schubert, C.J.; Rickert, D.; Widdel, F.; Gieseke, A.; Amann, R.; Jørgensen, B.B.; Witte, U.; Pfannkuche, O. (2000) A marine microbial consortium apparently mediating anaerobic oxidation of methane. *Nature* **407**: 623–626.
- Bowman, J. (2000) The Methanotrophs – The Families Methylococcaceae and Methylocystaceae. In *The prokaryotes*, an evolving electronic resource for the microbiological community Dworkin, M, Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H., and Stackebrandt, E. (eds.). Heidelberg: Springer Science Online ([www.prokaryotes.com](http://www.prokaryotes.com)).
- Breznak, J.A. & Costilow, R.N. (1994) Physicochemical factors in growth. In *Methods for general and molecular bacteriology*. Gerhard, P., Murray, R.G.E., Wood, W.A., and Krieg, N.R. (eds.). Washington: American Society for Microbiology Press, 137–154.
- Brodersen, J.; Bäumer, S.; Abken, H.-J.; Gottschalk, G.; Deppenmeier, U. (1999) Inhibition of membrane-bound electron transport of the methanogenic archaeon *Methanosarcina mazei* Gö1 by diphenyleneiodonium. *European Journal of Biochemistry* **259**: 218–224.



- Brysch, K.; Schneider, C.; Fuchs, G.; Widdel, F. (1987) Lithoautotrophic growth of sulfate-reducing bacteria, and description of *Desulfobacterium autotrophicum* gen. nov., sp. nov. *Archives of Microbiology* **148**: 264–274.
- Cord-Ruwisch, R. (1985) A quick method for the determination of dissolved and precipitated sulfides in cultures of sulfate-reducing bacteria. *Journal of Microbiology Methods* **4**: 33–36.
- Ehrenreich, A. & Widdel, F. (1994) Anaerobic oxidation of ferrous iron by purple bacteria, a new type of phototrophic metabolism. *Applied and Environmental Microbiology* **60**: 4517–4526.
- Elvert, M.; Suess, E.; Whiticar, M.J. (1999) Anaerobic methane oxidation associated with marine gas hydrates: superlight C isotopes from saturated and unsaturated C<sub>20</sub> and C<sub>25</sub> irregular isoprenoids. *Naturwissenschaften* **86**: 295–300.
- Fersht, A. (1985) Enzyme structure and mechanism, 2nd edn. New York: W.H. Freeman and Company.
- Fossing, H.; Ferdelman, T.G.; Berg, P. (2000) Sulfate reduction and methane oxidation in continental margin sediments influenced by irrigation (South-East Atlantic off Namibia). *Geochimica et Cosmochimica Acta* **64**: 897–910.
- Hansen, L.B.; Finster, K.; Fossing, H.; Iversen, N. (1998) Anaerobic methane oxidation in sulfate depleted sediments: effects of sulfate and molybdate additions. *Aquatic Microbial Ecology* **14**: 195–204.
- Harder, J. (1997) Anaerobic methane oxidation by bacteria employing <sup>14</sup>C-methane uncontaminated with <sup>14</sup>C-carbon monoxide. *Marine Geology* **137**: 13–23.
- Hinrichs, K.U.; Hayes, J.; Sylva, S.; Brewer, P.; DeLong, E. (1999) Methane-consuming archaeobacteria in marine sediments. *Nature* **398**: 802–805.
- Hinrichs, K.U. & Boetius, A. (2002) The anaerobic oxidation of methane: new insights in microbial ecology and biogeochemistry. In *Ocean Margin Systems*. Wefer, G., Billett, D., Hebbeln, D., Jørgensen, B.B., Schlüter, M., and van Weering, T. (eds), Heidelberg: Springer-Verlag.
- Hoehler, T.M.; Alperin, M.J.; Albert, D.B.; Martens, C.S. (1994) Field and laboratory studies of methane oxidation in an anoxic marine sediment: evidence for a methanogen-sulfate reducer consortium. *Global Biogeochemical Cycles* **8**: 451–463.

- Iversen, N. & Blackburn, T.H. (1981) Seasonal rates of methane oxidation in anoxic marine sediments. *Applied and Environmental Microbiology* **41**: 1295–1300.
- Iversen, N. & Jørgensen, B.B. (1985) Anaerobic methane oxidation rates at the sulfate-methane transition in marine sediments from Kattegat and Skagerrak (Denmark). *Limnology and Oceanography* **30**: 944–955.
- Iversen, N.; Oremland, R.S.; Klug, M.J. (1987) Big Soda Lake (Nevada). 3. Pelagic methanogenesis and anaerobic methane oxidation. *Limnology and Oceanography* **32**: 804–814.
- Jackson, B.E. & McInerney M.J. (2002) Anaerobic microbial metabolism can proceed close to thermodynamic limits. *Nature* **415**: 454–456.
- Knoblauch, C.; Sahm, K.; Jørgensen, B.B. (1999) Psychrophilic sulphate-reducing bacteria isolated from permanently cold Arctic marine sediments: description of *Desulfofrigus oceanense* gen. nov., sp. nov., *Desulfofrigus fragile* sp. nov., *Desulfofaba gelida* gen. nov., sp. nov., *Desulfotalea psychrophila* gen. nov., sp. nov., and *Desulfotalea arctica* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* **49**: 1631–1643
- Linke, P. & Suess, E. (2000) RV SONNE cruise report SO148, TECFLUX-II-2000. GEOMAR Report 98: 122
- Martens, C.S. & R.A. Berner (1974) Methane production in the interstitial waters of sulfate-depleted marine sediments. *Science* **185**: 1167–1169.
- Merkx, M.; Kopp, D.A.; Sazinsky, M.H.; Blazyk, J.L.; Muller, J.; Lippard, S.J. (2001) Dioxygen activation and methane hydroxylation by soluble methane monooxygenase: a tale of two irons and three proteins. *Angewandte Chemie International Edition England* **40**: 2782–2807.
- Murrell, J.C.; Gilbert, B.; McDonald, I.R. (2000) Molecular biology and regulation of methane monooxygenase. *Archives of Microbiology* **173**: 325–332.
- Myers, C.R. & Myers, J.M. (1992) Localization of cytochromes to the outer membrane of anaerobically grown *Shewanella putrefaciens* MR-1. *Journal of Bacteriology* **174**: 3429–3438.
- Orphan, V.J.; House, C.H.; Hinrichs, K.-U.; McKeegan, K.D.; DeLong, E.F. (2001) Methane-consuming archaea revealed by directly coupled isotopic and phylogenetic analysis. *Science* **293**: 484–487.

- Pancost, R.D.; Sinninghe Damsté, J.S.; de Lint, S.; van der Maarel, M.J.E.C.; Gottschal, J.C.; Medinaut shipboard scientific party (2000) Biomarker evidence for widespread anaerobic methane oxidation in Mediterranean sediments by a consortium of methanogenic archaea and bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **66**:1126–1132.
- Paull, C.K.; Chanton, J.P.; Neumann, A.C.; Coston, J.A.; Martens, C.S.; Showers, W. (1992). Indicators of methane-derived carbonates and chemosynthetic organic carbon deposits: examples from the Florida escarpment. *Palaios* **7**: 361–375.
- Preuß, A.; Schauder, R.; Fuchs, G. (1989) Carbon isotope fractionation by autotrophic bacteria with three different CO<sub>2</sub> fixation pathways. *Zeitschrift für Naturforschung* **44c**: 397–402.
- Rabus, R., Hansen, T.A.; Widdel, F. (2000) Dissimilatory sulfate- and sulfur-reducing prokaryotes. In *The Prokaryotes*, an evolving electronic resource for the microbiological community Dworkin, M.; Falkow, S.; Rosenberg, E.; Schleifer, K.-H.; Stackebrandt, E. (eds.). Heidelberg: Springer Science Online (www.prokaryotes.com).
- Rabus, R.; Nordhaus, R.; Ludwig, W.; Widdel, F. (1993) Complete oxidation of toluene under strictly anoxic conditions by a new sulfate-reducing bacterium. *Applied and Environmental Microbiology* **59**: 1444–1451.
- Reeburgh, W. (1976) Methane consumption in Cariaco Trench waters and sediments. *Earth and Planetary Science Letters* **28**: 337–344.
- Reeburgh, W. (1980) Anaerobic methane oxidation: rate depth distributions in Skan Bay sediments. *Earth and Planetary Science Letters* **47**: 345–352.
- Ritger, S.; Carson, B.; Suess, E. (1987) Methane-derived authigenic carbonates formed by subduction induced pore-water expulsion along the Oregon/Washington margin. *Bulletin of the American Geological Society* **98**: 147–156.
- Schink, B. & A.J.M. Stams (2001) Syntrophism Among Prokaryotes. In *The Prokaryotes*, an evolving electronic resource for the microbiological community Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H., and Stackebrandt, E. (eds.). Heidelberg: Springer Science Online (www.prokaryotes.com).

- Seeliger, S.R.; Cord-Ruwisch, R.; Schink, B. (1998) A periplasmic and extracellular c-type cytochrome of *Geobacter sulfurreducens* acts as ferric iron reductase and as electron carrier to other acceptors or to partner bacteria. *Journal of Bacteriology* **180**: 3686–3691.
- Shilov, A.E. & Shul'pin, G.B. (1997) Activation of C–H bonds by metal complexes. *Chemical Reviews* **97**: 2879–2932.
- Smith, R.L.; Howes, B.L.; Garabedian, S.P. (1991) In situ measurement of methane oxidation in groundwater by using natural-gradient tracer tests. *Applied and Environmental Microbiology* **57**: 1997–2004.
- Sørensen, K.B.; Finster, K.; & Ramsing, N.B. (2001) Thermodynamic and kinetic requirements in anaerobic methane oxidizing consortia exclude hydrogen, acetate and methanol as possible shuttles. *Microbial Ecology* **42**: 1–10.
- Spormann, A. & Widdel, F. (2000). Metabolism of alkylbenzenes, alkanes, and other hydrocarbons in anaerobic bacteria. *Biodegradation* **11**: 85–105.
- Stumm, W. & Morgan, J.J. (1996) Aquatic Chemistry 3rd edn. John Wiley & Sons, New York.
- Suess, E.; Torres, M.E., Bohrmann, G.; Collier, R.W.; Greinert, J.; Linke, P.; Rehder, G.; Trehu, A.; Wallmann, K.; Winckler, G.; Zuleger, E. (1999) Gas hydrate destabilization: enhanced dewatering, benthic material turnover and large methane plumes at the Cascadia convergent margin. *Earth and Planetary Science Letters* **170**: 1–15.
- Thauer, R.K. (1998) Biochemistry of methanogenesis: a tribute to Marjory Stephenson. *Microbiology* **144**: 2377–2406.
- Valentine, D.L.; Blanton, D.C.; Reeburgh, W.S. (2000) Hydrogen production by methanogens under low-hydrogen conditions. *Archives of Microbiology* **174**: 415–421.
- Widdel, F. & Bak, F. (1992) Gram-negative mesophilic sulfate-reducing bacteria. In *The Prokaryotes*. Balows, A., Trüper, H.G., Dworkin, M., Harder, W., and Schleifer, K.-H. (eds.). New York: Springer, 3352–3378.
- Widdel, F. & Rabus, R. (2001) Anaerobic biodegradation of saturated and aromatic hydrocarbons. *Current Opinion in Biotechnology* **12**: 259–276.

- Yamamoto, S.; Alcauskas, J.B.; Crozier, T.E. (1976) Solubility of methane in distilled water and seawater. *Journal of Chemical Engineering Data* 21: 78–80.
- Zabel, M. & H.D. Schulz (2001) Importance of submarine landslides for non-steady state conditions in pore water systems – lower Zaire (Congo) deep-sea fan. *Marine Geology* **176**: 87–99.
- Zehnder, A. & Brock, T. (1979) Methane formation and methane oxidation by methanogenic bacteria. *Journal of Bacteriology* **137**: 420–432.

## **Microbial reefs in the Black Sea fuelled by anaerobic oxidation of methane**

Walter Michaelis<sup>1\*</sup>, Richard Seifert<sup>1</sup>, Katja Nauhaus<sup>2</sup>, Tina Treude<sup>2</sup>, Volker Thiel<sup>1</sup>, Martin  
Blumenberg<sup>1</sup>, Katrin Knittel<sup>2</sup>, Armin Gieseke<sup>2</sup>, Katharina Peterknecht<sup>1</sup>, Thomas Pape<sup>1</sup>,  
Antje Boetius<sup>3</sup>, Rudolf Amann<sup>2</sup>, Bo Barker Jørgensen<sup>2</sup>, Friedrich Widde<sup>2</sup>, Jörn Peckmann<sup>4</sup>,  
Nikolai V. Pimenov<sup>5</sup>, Maksim B. Gulin<sup>6</sup>

Science (2002) 297: 1013-1015.

---

<sup>1</sup> Institute of Biogeochemistry and Marine Chemistry , University of Hamburg, Bundesstrasse 55, 20146 Hamburg, Germany.

<sup>2</sup> Max Planck Institute for Marine Microbiology, Celsiusstrasse, 28359 Bremen, Germany.

<sup>3</sup> Alfred Wegener Institute for Polar and Marine Research, 27515 Bremerhaven, and International University Bremen, 28725 Bremen, Germany.

<sup>4</sup> Geowissenschaftliches Zentrum, University of Göttingen, Goldschmidtstrasse 3, 37077 Göttingen, Germany.

<sup>5</sup> Institute of Microbiology, Russian Academy of Sciences, pr. 60-letiya Oktyabrya 7, k. 2, Moscow, 117811, Russia.

<sup>6</sup> Institute of Biology of Southern Seas, National Academy of Sciences of Ukraine, pr. Nakhimova 2, Sevastopol, Ukraine.

\*To whom correspondence should be addressed. E-mail: michaelis@geowiss.uni-hamburg.de

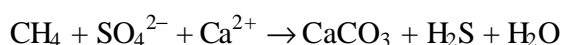
## **Abstract**

Massive microbial mats covering up to 4-m-high carbonate buildups prosper at methane seeps in anoxic waters of the northwestern Black Sea shelf. Strong  $^{13}\text{C}$  depletions indicate an incorporation of methane carbon into carbonates, bulk biomass, and specific lipids. The mats mainly consist of densely aggregated archaea (phylogenetic ANME-1 cluster) and sulfate-reducing bacteria (*Desulfosarcina/Desulfococcus* group). If incubated in vitro, these mats perform anaerobic oxidation of methane coupled to sulfate reduction. Obviously, anaerobic microbial consortia can generate both, carbonate precipitation and substantial biomass accumulation, which has implications for our understanding of carbon cycling during earlier periods of Earth's history.

## Main Text

Until recently it was believed that only aerobic bacteria, depending on oxygen as electron acceptor, build up significant biomass from methane carbon in natural habitats (Hanson & Hanson, 1996). Because biogenic methane is strongly depleted in  $^{13}\text{C}$ , a worldwide negative excursion in the isotopic signature of organic matter around 2.7 Ga (1 Ga =  $10^9$  years) ago was taken as an argument for methanotrophy and, consequently, an early oxygenation of the Earth's atmosphere (Hayes, 1994). However, recent investigations have shown the existence of methane-consuming associations of archaea and sulfate-reducing bacteria (SRB) in anoxic marine sediments (Boetius *et al.*, 2000; Orphan *et al.*, 2001a).

Microorganisms capable of anaerobic growth on methane have not been cultivated so far, and the biochemical pathway of the anaerobic oxidation of methane (AOM) remains speculative. Analyses of depth profiles and radiotracer studies in marine sediments (Hoehler *et al.*, 1994; Orphan *et al.*, 2002) as well as molecular (Elvert *et al.*, 1999; Hinrichs *et al.*, 1999; Thiel *et al.*, 1999; Pancost *et al.*, 2000) and petrographic studies (Peckmann *et al.*, 2001) argue for AOM (Valentine & Reeburgh, 2000) as a crucial process that channels  $^{13}\text{C}$ -depleted methane carbon into carbonate and microbial biomass. Through AOM mediated by consortia of archaea and SRB, methane is oxidized with equimolar amounts of sulfate, yielding bicarbonate and sulfide, respectively (Nauhaus *et al.*, 2002). Generation of alkalinity favors the precipitation of methane-derived bicarbonate according to the following net reaction:



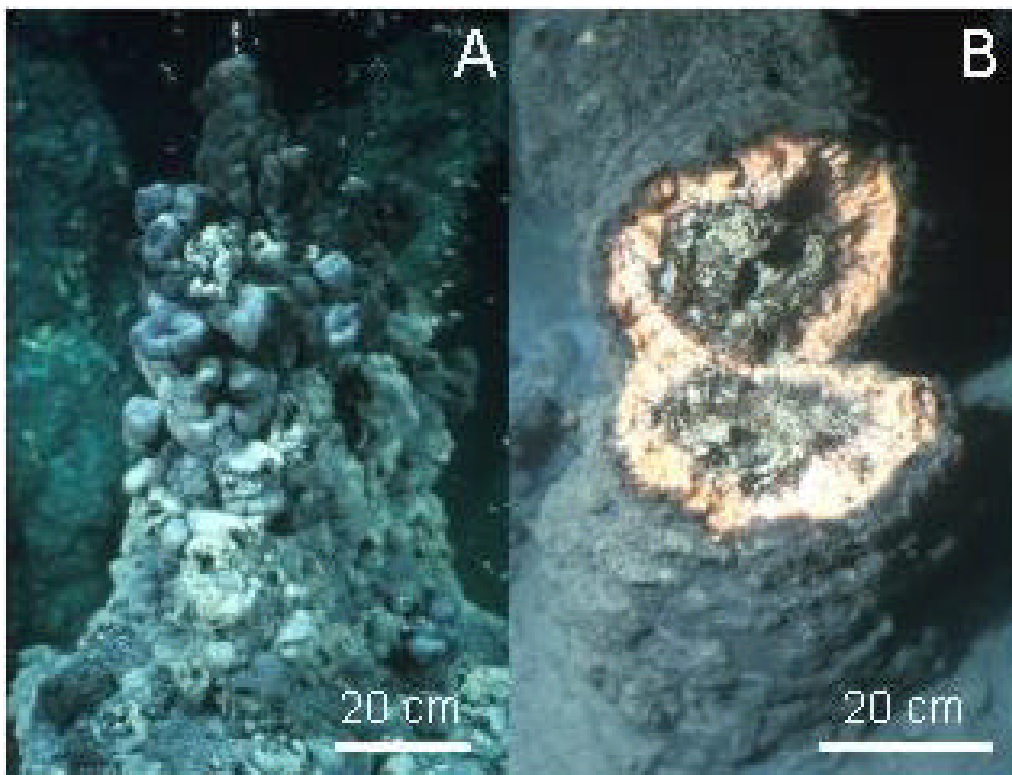
Here we provide evidence that vast amounts of microbial biomass may accumulate in an anoxic marine environment because of the use of methane as an electron donor for sulfate reduction (SR) and as an organic carbon source for cell synthesis.

In the northwestern Black Sea, hundreds of active gas seeps occur along the shelf edge west of the Crimea peninsula at water depths between 35 and 800 m (Ivanov *et al.*, 1991). At some of the shallow Crimean seeps, microbial mats were found associated with isotopically light carbonates. Aspects of the microbiology, sedimentology, mineralogy and



selected biomarker properties of these deposits were recently described (Lein, *et al.*, 2002; Peckmann *et al.*, 2001; Thiel *et al.*, 2001a; Pimenov *et al.*, 1997). We explored the seeps on the lower Crimean shelf using the manned submersible *JAGO* from aboard the Russian R/V *Professor Logachev*. During dives to a seep area at 44°46'N, 31°60'E, we discovered a reef consisting of up to 4-m-high and 1-m-wide microbial structures projecting into permanently anoxic bottom water at around 230 m water depth (Fig. 1A). These buildups are formed by up to 10-cm-thick microbial mats that are internally stabilized by carbonate precipitates (Fig. 1A).

From holes in these structures, streams of gas bubbles emanate into the water column (Fig. 1A). The gas contains about 95% methane [see supporting online material (SOM)]. In cross section, the outside of the soft mat has a dark grey to black color (Fig. 1B). Inside the structure, most of the mat is pink to brownish. The interior rigid parts are porous carbonates (aragonite and calcite with up to 14% MgCO<sub>3</sub>). Much of the structures consist of interconnected, irregularly distributed cavities and channels filled with seawater and gases. Apparently, the cavernous structure of these precipitates enables methane and sulfate to be transported and distributed throughout the massive mats. Smaller microbial structures and nodules from nearby areas were of the same morphology, with compact mat enclosing calcified parts and cavities. Obviously, the microorganisms do not grow on preformed carbonates but induce and shape their formation. Stable carbon isotope analyses of the carbonates yielded  $\delta^{13}\text{C}$  values ranging from  $-25.5$  to  $-32.2$  per mil (‰) [for methods, see Peckmann *et al.*, 2001]. Compared with the  $\delta^{13}\text{C}$  values of dissolved inorganic carbon in the Black Sea water column from  $+0.8$ ‰ at surface to  $-6.3$ ‰ at depth (Fry *et al.*, 1991), these values indicate that a major portion of the carbonate originates from the oxidation of methane. The methane seeping from the microbial structures, and from nearby sediment pockmarks is of biogenic origin, as indicated by  $\delta^{13}\text{C}$  values of  $-62.4$  to  $-68.3$ ‰ (n = 6) (SOM) and most probably evolves from a deeper sedimentary source.



**Fig 1** Image of microbial reef structures (as seen from the submersible). (A) Tip of a chimney-like structure. Free gas emanates in constant streams from the microbial structures into the anoxic sea water. (B) Broken structure of approx. 1 m height. The surface of the structure consists of grey-black coloured microbial mat, the interior of the massive mat is pink. The greenish-greyish inner part of the structure consists of porous carbonate which encloses microbial mats and forms irregular cavities.

Samples of living microbial mat were retrieved to investigate their microbiological and chemical composition as well as their catabolic activity. A short-term labeling experiment with added [ $^{14}\text{C}$ ]methane and [ $^{35}\text{S}$ ]sulfate (SOM) was performed directly after sampling. Pieces of mat incubated for 5 days in bottom water amended with methane (1.8 mM) exhibited AOM to carbon dioxide at a rate of  $18 (\pm 12) \mu\text{mol (gram dry weight)}^{-1} \text{d}^{-1}$  and SR at a rate of  $19 (\pm 1) \mu\text{mol (gram dry weight)}^{-1} \text{d}^{-1}$  ( $\pm\text{SD}$ ;  $n = 3$ ). In controls without mat samples, AOM and SR were below the detection limit. Results are in agreement with a stoichiometry of 1:1 between AOM and SR, as in experiments with sediment samples from a gas hydrate area (Nauhaus *et al.*, 2002). Methane-dependent SR to sulfide was also shown by chemical quantification with mat samples immediately

incubated with and without methane, respectively (incubation time, 60 days). SR rates under an atmosphere of methane were  $34 (\pm 5.8) \mu\text{mol (gram dry weight)}^{-1} \text{d}^{-1}$  ( $\pm\text{SD}$ ,  $n = 6$ ), whereas rates under nitrogen were  $2.8(\pm 0.55) \mu\text{mol (gram dry weight)}^{-1} \text{d}^{-1}$  ( $\pm\text{SD}$ ,  $n = 3$ ), probably because of gradual decay of biomass. Chemical quantification in another, long-term incubation experiment (166 days) again corroborated the 1:1 stoichiometry between AOM and SR (Nauhaus *et al.*, 2002). All these experiments indicate that methane is the main or only electron donor that accounts for SR and hence the buildup of the massive mat and carbonate structures in the investigated region of the Black Sea.

In extracts from homogenized mat samples, we observed isoprene-based constituents of archaeal lipids and hydrocarbons, such as archaeol, crocetane, and  $\text{C}_{40}$ -isoprenoids (acyclic, mono-, and dicyclic biphytanes) (Table 1) [see SOM (Fig. S1)]. A second compound cluster encompassed nonisoprenoid, linear and monomethyl-branched carbon skeletons of presumably bacterial origin. Most prominent among these structures are  $\omega$ -3 monomethylated (*anteiso*-)  $\text{C}_{15}$  carbon chains bound in glycerol esters and glycerol diethers. No such lipids were found in a surface sediment of a nearby non-seep area, whereas similar biomarker patterns typically occur at modern and fossil methane seeps and were consistently related to contributions from methane-consuming archaea and associated SRB (Table 1). Indeed, strong  $^{13}\text{C}$  depletions of the bulk biomass ( $-72.2\text{‰}$ ) and of the bacterial and archaeal lipids there (Table 1) indicate that the mat microbiota must have incorporated methane-derived carbon into their biomass. Hence, archaeal AOM and bacterial SR are relevant processes fuelling biomass production and reef formation in this permanently anaerobic seep environment.

**Tab 1** Selected biomarkers, their  $\delta^{13}\text{C}$ -values and most likely biological sources in the Black Sea microbial mat. The ‘Literature’ column quotes previous reports on these compounds in other methane-related environments. For additional information see (Fry *et al.*, 1991).

<i>Compound</i>	$\delta^{13}\text{C}$ [‰]	Source	Literature
Crocetane (2,6,11,15-tetramethylhexadecane)	$-94.7 \pm 0.7$	Archaea (?)	*1
PMI (2,6,10,15,19-pentamethylcosane)	$-95.6 \pm 0.1$	Archaea Methanosarcinales	*2
Archaeol (2,3-di-O-phytanyl- <i>sn</i> -glycerol)	$-87.9 \pm 0.6$	Archaea	*3
<i>sn</i> -2-Hydroxyarchaeol (2-O-3-hydroxyphytanyl-3-O-phytanyl- <i>sn</i> - glycerol)	$-90.0 \pm 1.0$	Archaea Methanosarcinales	*4
Biphytane (from tetraether after HI/AIH <sub>4</sub> cleavage)	$-91.6 \pm 0.6$	Archaea	Thiel <i>et al.</i> (2001a)
<i>n</i> -Tricos-10-ene	$-90.9 \pm 0.3$	unknown (Bacteria?)	Thiel <i>et al.</i> (2001b)
<i>Anteiso</i> -pentadecanoic acid (12-methyltetradecanoic acid)	$-83.9 \pm 0.1$	SRB	*5
1,2-Di-O-12-methyltetradecyl- <i>sn</i> -glycerol	$-89.5 \pm 0.5$	SRB	*6

\*1 Boetius *et al.* (2000); Elvert *et al.* (2000, 2001); Hinrichs *et al.* (2000); Pancost *et al.* (2000); Orphan *et al.* (2001b); Thiel *et al.* (2001a,b)

\*2 Boetius *et al.* (2000); Elvert *et al.* (2000, 2001); Hinrichs *et al.* (2000); Pancost *et al.* (2000); Orphan *et al.* (2001b); Thiel *et al.* (2001a,b)

\*3 Hinrichs *et al.* (1999, 2000); Boetius *et al.* (2000); Elvert *et al.* (2000, 2001); Pancost *et al.* (2000); Orphan *et al.* (2001b); Thiel *et al.* (2001b)

\*4 Hinrichs *et al.* (1999); Boetius *et al.* (2000); Pancost *et al.* (2000, 2001); Orphan *et al.* (2001b)

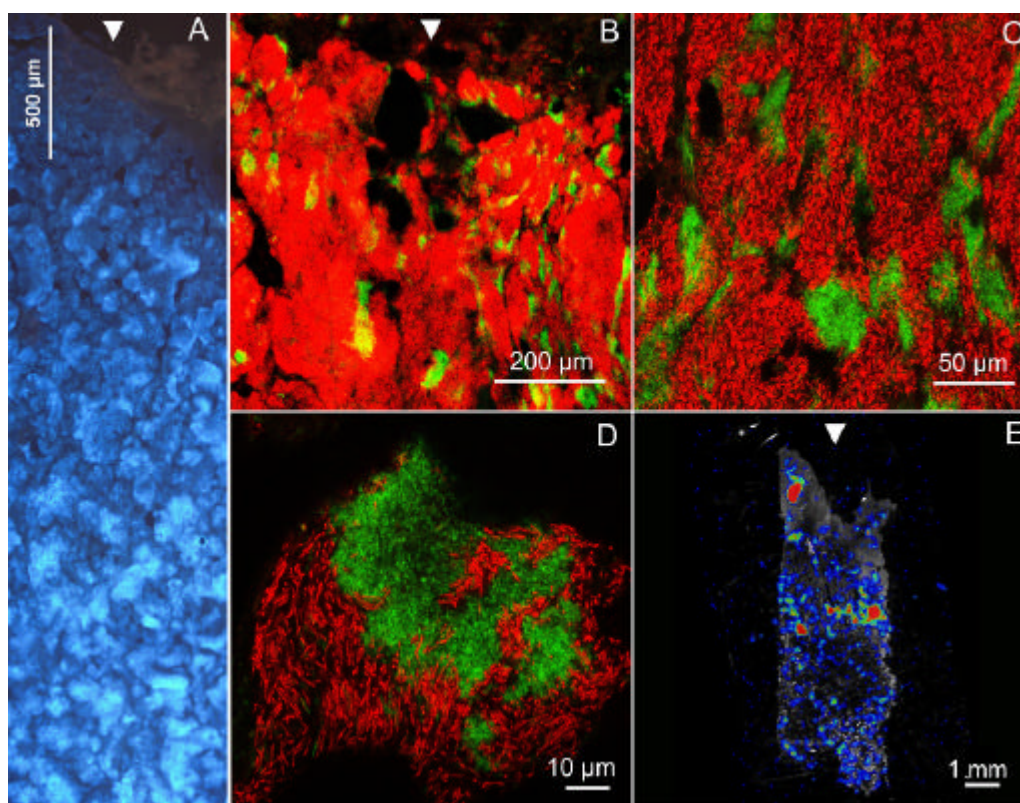
\*5 Boetius *et al.* (2000); Hinrichs *et al.* (2000); Pancost *et al.* (2000, 2001); Orphan *et al.* (2001b)

\*6 Orphan *et al.* (2001b); Pancost *et al.* (2001)

To directly trace the uptake and transformation of methane into organic and inorganic matter, we incubated 1-cm-thick pieces of microbial mat with radioactive methane ( $^{14}\text{CH}_4$ ), and analysed thin sections using a  $\beta$ -microimager that provides two-dimensional images of radioactivity distribution (see SOM). Incorporation of radiotracer into the solid phase was recorded throughout the sections, which demonstrates that methane is readily assimilated into the microbial mat (Fig. 2E). Upon acidification of the thin sections about 25% of the  $^{14}\text{C}$  radioactivity was lost. Obviously, a fraction of the methane carbon had been precipitated as carbonate. This approach provides direct laboratory

evidence for methane-fuelled calcification and for the microbially mediated formation of carbonate structures.

Epifluorescence microscopy of sections of microbial mat revealed dense aggregations of archaea and bacteria (Fig. 2) (see SOM). The mats are penetrated by systems of microchannels that enable advective exchange with the surrounding seawater (Fig. 2A). The microchannels radiate out from the inner calcified part of the mat system and make up between 20 and 40% of the bulk mat volume. Fluorescence *in situ* hybridization (see SOM) shows that the mat biomass is dominated by one archaeal population comprising at least 70% of the mat biomass and belonging to the cluster ANME-1 (Fig. 2, B, C, D). ANME-1 is only distantly related to the Methanosarcinales and the ANME-2 cluster, which forms consortia with SRB and is known to be capable of AOM (Boetius *et al.*, 2000; Orphan *et al.*, 2001a, 2002). Nevertheless, the microbial mat dominated by ANME-1 comprises a similar pattern of the <sup>13</sup>C-depleted archaeal biomarkers crocetane, pentamethylcosane, pentamethylcosenes, archaeol, and *sn*-2-hydroxyarchaeol [see SOM (Fig. S1)], as Hydrate Ridge sediments (Boetius *et al.*, 2000; Elvert *et al.*, 1999), in which archaea of the ANME-2 cluster prevail (Boetius *et al.*, 2000). The most abundant bacterial population in the mats from the Black Sea belongs to the *Desulfosarcina/Desulfococcus* group, the same taxon of SRB as found in the ANME-2/SRB consortium (Boetius *et al.*, 2000).



**Fig 2** Fluorescence image showing a thin section of the pink mat. Scale bars indicate the different microscopic magnifications. The arrow marks the outside of the microbial mat. (A) A thin section of mat stained with DAPI (see SOM). (B) Archaea of the cluster ANME-1 were targeted with a red-fluorescent group-specific oligonucleotide probe. The SRB were targeted with a probe specific for a cluster of  $\delta$ -proteobacteria in the *Desulfosarcina/Desulfococcus* group and fluoresce green. These two populations comprise the bulk biomass in the microbial mat. (C) Microcolonies of SRB are surrounded by bulk ANME-I cell clusters. (D) ANME-1 cells have a unique rectangular shape, SRB are small coccoid cells. Single SRB cells are dispersed throughout the ANME-I cell clusters. (E) beta-imager micrograph of a thin section of mat incubated with  $^{14}\text{CH}_4$  (see SOM). The micrograph shows the incorporated radioactivity of the mat after acidification. Green and red areas depict uptake of  $^{14}\text{C}$ .

ANME-1 cells have a cylindrical shape and are autofluorescent under ultraviolet light, a feature typical for archaea containing coenzyme  $\text{F}_{420}$ . Their length is about  $3.5 \mu\text{m}$  and their diameter about  $0.6 \mu\text{m}$  (biovolume about  $1 \mu\text{m}^3$ ). The coccoid SRB (cell diameter, about  $0.6 \mu\text{m}$ , biovolume, about  $0.1 \mu\text{m}^3$ ) occur in larger clusters of 10 to  $50 \mu\text{m}$  diameter (Fig. 2, B and C). Smaller clusters and single cells of SRB are dispersed throughout the

bulk ANME-1 biomass (Fig. 2D). One  $\text{cm}^3$  mat contains about  $10^{12}$  cells (see SOM), corresponding to approx. 25 mg carbon.

The growth yield of the mat community is currently unknown. Prokaryotes deriving their energy from dissimilatory SR generally have low growth yields. Pure cultures of SRB growing on conventional substrates (for example, organic acids) usually convert only one-tenth of the totally consumed organic compounds into cell mass, but the free energy gain obtained (for example on lactate,  $\Delta G$  around  $-100$  kJ per mol of sulfate) remains higher than that of AOM. Even with high methane partial pressure as at the active seeps studied (up to about 20 atm), the  $\Delta G$  should not exceed  $-40$  kJ per mol methane oxidized (see SOM). Hence, an even lower growth yield than for conventional cultures of SRB must be expected for the Black Sea mats. Consequently, the amount of methane oxidized for the buildup and maintenance of the existing mat structures should exceed their organic carbon content by more than an order of magnitude.

Microbial mats of the size presently observed are rarely found in oxic environments. This may reflect the absence of metazoan grazing and other mortality factors in the permanently anoxic and sulfidic environment of the Black Sea. There is increasing evidence that the capacity for AOM is present in several deep-branching clades of Archaea (Orphan *et al.*, 2001b), which indicates an early evolutionary origin, just as for methanogenesis.

AOM may have influenced the carbon isotope record of the Archaean (Hinrichs & Boetius, 2002). Moreover, recent studies suggest that SR has already been prolific 3.5 Ga ago (Shen *et al.*, 2001), close to the first occurrence of microfossils (3.5 Ga ago) (Schopf, 1993) and the first isotopic traces of bioorganic carbon cycling (3.8 Ga ago) (Mojszisz *et al.*, 1996). Hence, AOM may have represented an important link in the biological cycling of carbon in an anoxic biosphere. Even in the absence of free oxygen, methane formed by anaerobic degradation (fermentation and methanogenesis) of organic matter could have been recycled via AOM, leading to substrates (inorganic carbon and sulfide) for anoxygenic photosynthesis of new biomass. In this respect, the microbial reefs discovered at Black Sea methane seeps suggest how large parts of the ancient ocean might have looked when oxygen was a trace element in the atmosphere, long before the onset of metazoan evolution.

## **Acknowledgement**

We thank the crew of the R/V Professor Logachev and the JAGO team for excellent collaboration during field work, and S. Beckmann, S. Ertl, O. Schmale, and M. Hartmann for analytical work. This study received financial support through programs GHOSTDABS (03G0559A) and MUMM (03G0554A) of the Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF), the Deutsche Forschungsgemeinschaft (Th 713/2), the University of Hamburg, the ZEIT-Stiftung Ebelin und Gerd Bucerius, and the Max-Planck-Gesellschaft (Germany). This is publication GEOTECH-3 of the GEOTECHNOLOGIEN program of the BMBF and the DFG and publication No. 1 of the research program GHOSTDABS.



## References and Notes

- Boetius, A.; Ravensschlag, K.; Schubert, C.; Rickert, D.; Widdel, F. *et al.* (2000) A marine microbial consortium apparently mediating anaerobic oxidation of methane. *Nature* **407**: 623-626.
- Elvert, M.; Suess, E.; Whiticar, M.J. (1999) Anaerobic methane oxidation associated with marine gas hydrates: superlight C-isotopes from saturated and unsaturated C<sub>20</sub> and C<sub>25</sub> irregular isoprenoids. *Naturwissenschaften* **86**: 295-300.
- Elvert, M.; Suess, E.; Greinert, J.; Whiticar, M.J. (2000) Archaea mediating anaerobic methane oxidation in deep-sea sediments at cold seeps of the eastern Aleutian subduction zone. *Organic Geochemistry* **31**: 1175-1187.
- Elvert, M.; Greinert, J.; Suess, E.; Whiticar, M. (2001) Carbon isotopes of biomarkers derived from methane-oxidizing microbes at Hydrate Ridge, Cascadia Convergent Margin. In Dillon, W. und Paull, C. (eds.) *Natural Gas Hydrates: Occurrence, Distribution, and Detection*. American Geophysical Union, Monograph Series **124** pp: 115-129.
- Fry, B.; Jannasch, H.W.; Molyneaux, S.J.; Wirsén, C.O.; Muramoto, J.A.; King, S. (1991) Stable isotope studies of the carbon, nitrogen and sulfur cycles in the Black Sea and the Cariaco Trench. *Deep Sea Research* **38**: S1003-S1019 (Suppl. 2).
- Hanson, R.S. und Hanson, T.E. (1996) Methanotrophic bacteria. *Microbiological Reviews* **60**: 439-471.
- Hayes, J.M. (1994) Global Methanotrophy at the Archaean-Proterozoic transition. Bengtson, S.; Bergström, J.; Gonzalo, V.; Knoll, A. (eds.) In *Nobel Symposium* (Columbia University Press, New York) pp: 220-236.
- Hinrichs, K.-U.; Hayes, J.M.; Sylva, S.P.; Brewer, P.G.; DeLong, E.F. (1999) Methane-consuming archaeobacteria in marine sediments. *Nature* **398**: 802-805.
- Hinrichs, K.-U.; Summons, R.E.; Orphan, V.J.; Sylva, S.P.; Hayes, J.M. (2000) Molecular and isotopic analysis of anaerobic methane-oxidizing communities in marine sediments. *Organic Geochemistry* **31**: 1685-1701.
- Hinrichs, K.-U. und Boetius, A. (2002) The anaerobic oxidation of methane: new insights in microbial ecology and biogeochemistry. pp. 457-477. Wefer, G.; Billet, D.;

- Hebbeln, D.; Jørgensen, B.B.; Schlüter, M.; van Weering, T. (eds.) In: *Ocean margin Systems* Springer Verlag Berlin-Heidelberg.
- Hoehler, T.M.; Alperin, M.J.; Albert, D.B.; Martens, C.S. (1994) Field and laboratory studies of methane oxidation in an anoxic marine sediment: evidence for a methanogen-sulfate reducer consortium. *Global Biogeochemical Cycles* **8**: 451-463.
- Ivanov, M.V.; Polikarpov, G.G.; Lein, A.Y. *et al.* (1991) Biogeochemistry of the carbon cycle in the zone of Black Sea methane seeps. *Dokl. Akad. Nauk SSSR* **320**: 1235-1240.
- Lein, A.Y.; Ivanov, M.V.; Pimenov, N.V.; Gulin, M.B. (2002) Geochemical characteristics of the carbonate constructions formed during microbial oxidation of methane under anaerobic conditions. *Microbiology* **70**: 78-90.
- Mojszisz, S.J.; Arrhenius, G.; McKeegan, K.D.; Harrison, T.M.; Nutman, A.P.; Friend, C.R.L. (1996) Evidence for life on earth before 3,800 million years ago. *Nature* **384**: 55-59.
- Nauhaus, K.; Boetius, A.; Krüger, M.; Widdel, F. (2002) *In vitro* demonstration of anaerobic oxidation of methane coupled to sulphate reduction in sediment from a marine gas hydrate area. *Environmental Microbiology* **4**: 296-305.
- Orphan, V.J.; House, C.H.; Hinrichs, K.-U.; McKeegan, K.D.; DeLong, E.F. (2001a) Methane-consuming archaea revealed by directly coupled isotopic and phylogenetic analysis. *Science* **293**: 484-487.
- Orphan, V.J.; Hinrichs, K.-U.; Ussler III, W.; Paull, C.K.; Taylor, L.T. *et al.* (2001b) Comparative analysis of methane-oxidizing Archaea and sulfate-reducing bacteria in anoxic marine sediments. *Applied and Environmental Microbiology* **67**: 1922-1934.
- Orphan, V.J.; House, C.H.; Hinrichs, K.-U.; McKeegan, K.D.; DeLong, E.F. (2002) Multiple archaeal groups mediate methane oxidation in anoxic cold seep sediments. *Proceedings of the National Academy of Science USA* **99**: 7663-7668.
- Pancost, R.D.; Damsté, J.S.S.; DeLint, S.; van der Maarel, M.J.E.C.; Gottschal, J.C. (2000) Biomarker evidence for widespread anaerobic methane oxidation in Mediterranean sediments by a consortium of methanogenic Archaea and bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **66**: 1126-1132.

- Pancost, R.D.; Bouloubassi, I.; Aloisi, G.; Sinninghe Damsté, J.S., the Medinaut Shipboard Party (2001) Three series of non-isoprenoidal dialkyl glycerol diethers in cold-seep carbonate crusts. *Organic Geochemistry* **32**: 695-707.
- Peckmann, J.; Reimer, A.; Luth, U.; Luth, C.; Hansen, B.T. *et al.* (2001) Methane-derived carbonates and authigenic pyrite from the northwestern Black Sea. *Marine Geology* **177**: 129-150.
- Pimenov, N.V.; Rusanov, I.I.; Poglazova, M.N.; Mityushina, L.L.; Srokin, D.Y. *et al.* (1997) Bacterial mats on coral-like structures at methane seeps in the Black Sea. *Microbiology* **66**: 354-360.
- Schopf, J.W. (1993) Microfossils of the early Archaean Apex Chert – New evidence of the antiquity of life. *Science* **260**: 640-646.
- Shen, Y.; Buick, R.; Canfield, D. (2001) Isotopic evidence for microbial sulphate reduction in the early Archaean era. *Nature* **410**: 77-81.
- Thiel, V.; Peckmann, J.; Seifert, R.; Wehrung, P.; Reitner, J.; Michaelis, W. (1999) Highly isotopically depleted isoprenoids: molecular markers for ancient methane venting. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **63**: 3959-3966.
- Thiel, V.; Peckmann, J.; Richnow, H.H.; Luth, U.; Reitner, J.; Michaelis, W. (2001a) Molecular signals for anaerobic methane oxidation in Black Sea seep carbonates and a microbial mat. *Marine Chemistry* **73**: 97-112.
- Thiel, V.; Peckmann, J.; Schmale, O.; Reitner, J.; Michaelis, W. (2001b) A new straight-chain hydrocarbon biomarker associated with anaerobic methane cycling. *Organic Geochemistry* **32**: 1019-1023.
- Valentine, D.L. und Reeburgh, W.S. (2000) New perspectives on anaerobic methane oxidation. *Environmental Microbiology* **2**: 477-484.

---

Supporting Online Material

[www.sciencemag.org/cgi/content/full/297/5583/1013/DC1](http://www.sciencemag.org/cgi/content/full/297/5583/1013/DC1)

Materials and Methods

Fig. S1

# Microbial reefs in the Black Sea fuelled by anaerobic oxidation of methane

W. Michaelis *et al.*, ms # 1072502

## Supporting online material

### Materials and Methods

#### *Gas sampling and analysis*

Emanating gas was sampled by submersible at the sea floor. Methane concentrations were measured on board by direct injection into a gas chromatograph (GC). For GC set up see (Seifert *et al.*, 1999).

#### *Stable carbon isotope analyses*

Coupled gas chromatography-combustion-isotope ratio mass spectrometry (GC-C-IRMS) was conducted using a Finnigan DeltaPlusXL mass spectrometer equipped with a HP 6890 gas chromatograph and CuO/Ni/Pt combustion furnace operated at 940°C (biomarkers) or 1010°C (methane). For  $d^3C$  of methane, gases were injected (2 or 10 ml) via an 8Port Valco-valve into a carrier gas flow of about 6 ml min<sup>-1</sup>. After passing a Nafion-dryer, the gasses were trapped on a Gerstel Cooled Injection System 4 (CIS4) packed with 10 mg PoraPak Q (80–100 mesh) and operated in splitless mode at -135 °C for 8 min. The gases were desorbed through heating the injector to 60 °C at 12 °C min<sup>-1</sup> and held at this temperature for 1.6 min. The gas chromatograph was equipped with a CP Plot molsieve 5 Å capillary column (25 m, 0,32 mm i.d., 30 µm film thickness), which ensures separation of methane from N<sub>2</sub> at ambient temperatures (30 °C). Standard deviations for replicate injections were less than 0.7‰. GC-C-IRMS precision was checked daily using a methane standard with known isotopic composition.

For lipids, samples were injected splitless (1 min) onto a 30 m fused silica column (DB5-MS, 0.32 mm i.d., 0.25  $\mu\text{m}$  film thickness) using a Gerstel Cooled Injection System (CIS4) programmed from 48  $^{\circ}\text{C}$  (0 min) to 310  $^{\circ}\text{C}$  (10 min) at 12  $^{\circ}\text{C sec}^{-1}$ . Carrier gas: He. GC temperature program: 3 min at 80  $^{\circ}\text{C}$ ; from 80  $^{\circ}\text{C}$  to 310  $^{\circ}\text{C}$  at 4  $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ ; 30 min at 310  $^{\circ}\text{C}$ . Standard deviations for replicate injections were less than 1.0%. GC-C-IRMS precision was checked daily using a standard alkane mix ( $n\text{-C}_{15}$  to  $n\text{-C}_{29}$ ) with known isotopic composition. The stable carbon isotope compositions are reported in the delta notation ( $\delta^{13}\text{C}$ ) vs. the V-PDB Standard.

#### *Short term incubations*

Short term incubations were carried out at *in situ* salinity, temperature, and sulfate concentrations. AOM was measured with  $^{14}\text{CH}_4$  as radiotracer according to (Iversen & Blackburn, 1981), with adaptations regarding the  $^{14}\text{CO}_2$  trapping according to (Boetius *et al.*, 2001). SR was measured with  $^{35}\text{SO}_4^{2-}$  as radiotracer according to (Boetius *et al.*, 2001).

#### *Long term incubations*

In long term incubation experiments, consumption of methane and simultaneous formation of sulfide were followed via chemical analysis (gas chromatography and colorimetric test, respectively). The incubations were carried out in strictly anoxic seawater medium with slight modifications of a method described elsewhere (Nauhaus *et al.*, 2002). The sulfate concentration was adjusted to the *in situ* concentration of 16 mM, and anoxic, stoppered culture tubes with a gas phase (methane, or nitrogen for control) were used instead of the completely filled devices (Nauhaus *et al.*, 2002). Both, gaseous and dissolved methane concentrations were determined.

#### *Calculation of free energy change*

The free energy change of AOM according to  $\text{CH}_4 + \text{SO}_4^{2-} \rightarrow \text{HCO}_3^- + \text{HS}^- + \text{H}_2\text{O}$  under consideration of *in situ* concentrations and partial pressures was calculated as described in (Nauhaus *et al.*, 2002; Boetius *et al.*, 2000).

### *Imaging of <sup>14</sup>C uptake*

Small pieces of samples (1-2 cm<sup>3</sup>) stored in *in situ* water (13 cm<sup>3</sup>) without gas headspace were incubated with <sup>14</sup>C-methane for 45 days at *in situ* temperature (9°C). Samples were fixed with paraformaldehyde solution, and 20 µm thin sections were prepared as previously described (Schramm *et al.*, 1996). Sections were transferred to gelatine coated slides, and, after drying, used for high-resolution 2d beta imaging (Laniece *et al.*, 1998) on a beta microimager (Biospace Mésures, Paris, France). Scans were performed for 3 h. Individual section surface was between 15 and 80 mm<sup>2</sup>, and total activity per section measured was between 0.18 and 2.89 cpm mm<sup>-2</sup> (background: <0.04 cpm mm<sup>-2</sup>). Sections washed with 0.1 M glycine buffer, pH 2.0, were used as a control for non-incorporated, precipitated radioactivity.

### *Microscopy and FISH*

Microbial mat fixation and cutting was performed as previously described (Schramm *et al.*, 1996). Staining of cells with DAPI and fluorescence-*in situ*-hybridization was performed according to (8) by using the archaeal ANME-1 specific (ANME1-350-cy3-AGTTTTCGCGCCTGATGC) and the bacterial *Desulfococcus/Desulfosarcina* specific (DSS658-FLUOS- TCCACTTCCCTCTCCCAT) oligonucleotide probes (Boetius *et al.*, 2000). For other FISH probes see (Orphan *et al.*, 2002). Cy3- and carboxyfluorescein (FLUOS-) labeled oligonucleotides were obtained from Interactiva (Germany). Digital images of mat sections after hybridization were taken by confocal laser scanning microscopy on a Zeiss LSM510 microscope (Carl Zeiss, Jena, Germany). The size and number of cells and the biomass ratio between ANME-1 and SRB were determined by taking images via confocal laser scanning microscopy and subsequent half-automated image analysis (determination of pixel per area). The length and width of 120 cells from 8 different slices of microbial mat were measured and the bacterial cell volume was calculated assuming a cylindrical (ANME-1) or spherical (SRB) shape.

### *Analyses of lipid biomarkers*

Lipid biomarkers were analyzed from subsamples of the microbial mats used for the rate measurements and phylogenetic analyses. The wet mat sample (1.4 g) was saponified in 6% KOH in methanol (75 °C, 3 h) and extracted with *n*-hexane to yield the neutral lipids. Carboxylic acid methyl esters were obtained by acidification of the residual phase to pH 1, extraction with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, and treatment of the dry extract with trimethylchlorosilane (TMCS) in methanol (1:8, [v:v]; 2 h at 70 °C). The neutral lipids were separated by thin layer chromatography (silica gel 60, 0.25 mm, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) into (I) polar compounds including di- and polyols, such as mono- and tetraether lipids (Rf 0 to 0.1), (II) mono-alcohols including diether lipids (Rf 0.1 to 0.35), and (III) apolar compounds including hydrocarbons (Rf 0.35 to 1). Aliquots of the neutral lipid fractions (I) and (II) were combined and subjected to ether cleavage through HI treatment (2 h at 110 °C) and reduction of the resulting iodides using LiAlH<sub>4</sub> in dry ether under an Ar-atmosphere (King *et al.*, 1998). Biomarkers were analyzed by combined gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) using a Micromass Quattro II spectrometer (EI, 70 eV) interfaced to a HP6890 GC with a 30 m fused silica capillary column (DB5-MS, 0.32 mm i.d., 0.25 μm film thickness). Carrier gas: He. Temperature program: 5 min at 80 °C; from 80 °C to 310 °C at 4 °C min<sup>-1</sup>; 20 min at 310 °C. Compounds were identified by comparison of mass spectra and retention characteristics with published data and/or reference compounds, in particular crocetane: synthetic standard (kindly provided by S. Rowland); archaeol: (Teixidor & Grimalt, 1992); *sn*-2-hydroxyarchaeol: (Hinrichs *et al.*, 2000); PMI Δ: (Schouten *et al.*, 1997; Elvert *et al.*, 1999); biphytanes: authentic standards obtained from *Sulfolobus solfataricus* (kindly provided by G. Antranikian); 1,2-di-O-12-methyltetradecyl (*anteiso*-C<sub>15</sub>)-*sn*-glycerol: (Pancost *et al.*, 2001) and HI/LiAlH<sub>4</sub> treatment of the combined neutral lipid fractions (II) and (III) yielding 3-methyltetradecane as a main compound (see Fig. S1, bottom).

## References

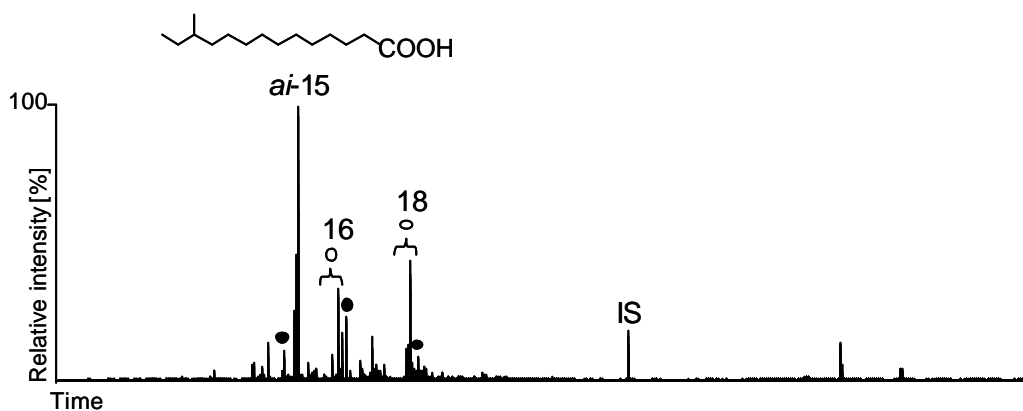
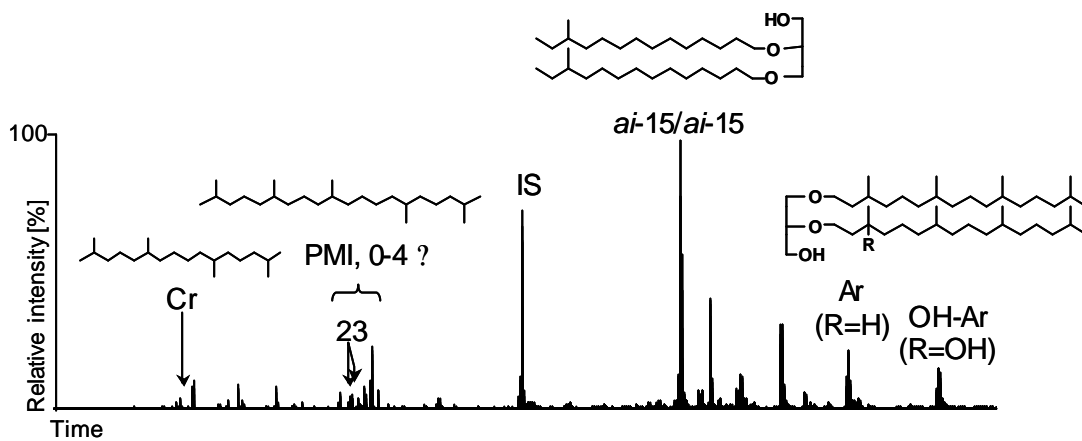
- Boetius, A.; Ravensschlag, K.; Schubert, C.; Rickert, D.; Widdel, F. *et al.* (2000) A marine microbial consortium apparently mediating anaerobic oxidation of methane. *Nature* **407**: 623-626.
- Boetius, A.; Ferdelmann, T.; Lochte, K. (2001) Bacterial activity in sediments of the deep Arabian Sea in relation to vertical flux. *Deep Sea Research II* **47**: 2835-2875.
- Elvert, M.; Suess, E.; Whiticar, M.J. (1999) Anaerobic methane oxidation associated with marine gas hydrates: superlight C isotopes from saturated and unsaturated C<sub>20</sub> and C<sub>25</sub> irregular isoprenoids. *Naturwissenschaften* **86**: 295-300.
- Hinrichs, K.-U.; Hayes, J.M.; Sylva, S.P.; Brewer, P.G.; DeLong, E.F. (1999) Methane-consuming archaeobacteria in marine sediments. *Nature* **398**: 802-805.
- Hinrichs, K.-U.; Pancost R. D.; Summons R. E.; Sprott G. D.; Sylva S. P.; Sinninghe Damsté J. S.; Hayes J. M. (2000) Mass spectra of sn-2-hydroxyarchaeol, a polar lipid biomarker for anaerobic methanotrophy. *Geochemistry, Geophysics, Geosystems* **1**, Paper number 2000GC000042. Published May 30, 2000.
- Iversen, N. und Blackburn, T.H. (1981) Seasonal rates of methane oxidation in anoxic marine sediments. *Applied and Environmental Microbiology* **41**: 1295-1300.
- Jahnke, L.L.; Eder, W.; Huber, R.; Hope, J.M.; Hinrichs, K.-U.; Hayes, J.M.; Des Marais, D.J.; Cady, S.L.; Summons, R.E. (2001) Signature lipids and stable carbon isotope analyses of octopus spring hyperthermophilic communities compared with those of Aquificales representatives. *Applied and Environmental Microbiology* **67**: 5179-5189.
- King, L.L.; Pease, T.K.; Wakeham, S.G. (1998) Archaea in Black Sea water column particulate matter and sediments - evidence from ether lipid derivatives. *Organic Geochemistry* **28**: 677-688.
- Laniece, P.; Charon, Y.; Cardona, A.; Pinot, L.; Maitrejean, S.; Mastrippolito, R.; Sandkamp, B.; Valentin, L. (1998) A new high resolution radioimager for the quantitative analysis of radiolabelled molecules in tissue section. *Journal of Neuroscience Methods* **86**:1-5.



- Nauhaus, K.; Boetius, A.; Krüger, M.; Widdel, F. (2002) *In vitro* demonstration of anaerobic oxidation of methane coupled to sulphate reduction in sediment from a marine gas hydrate area. *Environmental Microbiology* **4**: 296-305.
- Orphan, V.J.; Hinrichs, K.-U.; Ussler III, W.; Paull, C.K.; Taylor, L.T. *et al.* (2001) Comparative analysis of methane-oxidizing Archaea and sulfate-reducing bacteria in anoxic marine sediments. *Applied and Environmental Microbiology* **67**: 1922-1934.
- Orphan, V.J.; House, C.H.; Hinrichs, K.-U.; MaKeegan, K.D.; DeLond, E.F. (2002) Multiple archaeal groups mediate methane oxidation in anoxic cold seep sediments. *Proceedings of the National Academy of Science USA* **99**: 7663-7668.
- Pancost, R.D.; Bouloubassi, I.; Aloisi, G.; Sinninghe Damsté, J.S., the Medinaut Shipboard Party (2001) Three series of non-isoprenoidal dialkyl glycerol diethers in cold-seep carbonate crusts. *Organic Geochemistry* **32**: 695-707.
- Rütters, H.; Sass, H.; Cypionka, H.; Rullkötter, J. (2001) Monoalkylether phospholipids in the sulfate-reducing bacteria *Desulfosarcina variabilis* and *Desilforhabdus amnigenus*. *Archives of Bacteriology* **176**: 435-442.
- Schouten, S.; van der Maarel, M.J.E.C.; Huber, R.; Sinninghe Damsté, J.S. (1997) 2,6,10,15,19-Pentamethylcosenes in *Methanobrevibacter smithii*, a marine methanogenic archaeon, and in *Methanosarcina mazei*. *Organic Geochemistry* **26**: 409-414.
- Schramm, A.; Larsen, L.H.; Revsbech, N.P.; Ramsing, N.B.; Amann, R.; Schleifer, K.-H. (1996) Structure and function of a nitrifying biofilm as determined by in situ hybridization and the use of microelectrodes. *Applied and Environmental Microbiology* **62**: 4641-4647.
- Seifert, R.; Delling, N.; Richnow, H.H.; Kempe, S.; Hefter, J.; Michaelis, W. (1999) Ethylene and methane in the upper water column of the subtropical Atlantic. *Biogeochemistry* **44**: 73-91.
- Sinninghe Damsté, J.S.; Hopmans, E.C.; Pancost, R.D.; Schouten, S.; Geenevasen, J.A.J. (2000) Newly discovered non-isoprenoid glycerol dialkyl glycerol tetraether lipids in sediments. *Chemical Communications* **17**: 1683-1684.

- Snaidr, J.; Amman, R.; Huber, I.; Ludwig, W.; Schleifer, K.-H. (1997) Phylogenetic analysis and in situ identification of bacteria in activated sludge. *Applied and Environmental Microbiology* **63**: 2884-2896.
- Teixidor, P.; Grimalt, J.O. (1992) Gas-Chromatographic determination of isoprenoid alkylglycerol diethers in archaeobacterial cultures and environmental samples. *Journal of Chromatography* **607**: 253-259.
- Thiel, V.; Peckmann, J.; Seifert, R.; Wehrung, P.; Reitner, J.; Michaelis, W. (1999) Highly isotopically depleted isoprenoids: molecular markers for ancient methane venting. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **63**: 3959-3966.
- Thiel, V.; Peckmann, J.; Richnow, H.H.; Luth, U.; Reitner, J.; Michaelis, W. (2001) Molecular signals for anaerobic methane oxidation in Black Sea seep carbonates and a microbial mat. *Marine Chemistry* **73**: 97-112.
- (1) The isoprenoid crocetane is very characteristic for modern and ancient methane seep environments. It is considered to derive from particular, methane-consuming archaea, though no definite biological source has as yet been identified. The presence of crocetane in the Black Sea microbial mat might point to an origin from ANME-1 archaea. However, a previous study on deposits from another seep location in the Black Sea showed the absence of crocetane in a microbial mat but its prominent occurrence in an associated, massive carbonate (Thiel *et al.*, 2001). Other work reported the absence of crocetane in seep deposits populated by ANME-1 (Hinrichs *et al.*, 1999), but also, its presence in an 'ANME-2 environment', where ANME-1 archaea were found to be virtually lacking (Boetius *et al.*, 2000). At present, it is not clear whether this is due to sporadic biosynthesis of crocetane by these taxa under varying trophic conditions, or to the presence of other, yet unknown contributors of crocetane in these settings. In any case, occurrences of crocetane in fossil samples indicate the presence of the source organisms through geological times and provide a specific fingerprint for AOM in ancient ecosystems (Thiel *et al.*, 1999, 2001).

- (2) Chemical degradation using HI/LiAlH<sub>4</sub> was performed to selectively release ether bonded alkyl moieties from membrane lipids. Whereas the C<sub>40</sub> biphytanes derive from archaeal glycerol tetraethers, the C<sub>20</sub>-isoprenoid hydrocarbon 3,7,11,15-tetramethylhexadecane (phytane) is probably released from archaeol and *sn*-2-hydroxyarchaeol. The presence of 3-methyltetradecane obviously derives from the abundant 1,2-di-O-12-methyltetradecyl-*sn*-glycerol (Fig. 1, top). Glycerol ether lipids with non-isoprenoidal substituents have recently been reported from a number of modern environments (Sinninghe Damsté *et al.*, 2000; Jahnke *et al.*, 2001), including methane-rich deposits (Hinrichs *et al.*, 1999; Pancost *et al.*, 2001). These lipids are not known from Archaea, but occur in a small number of bacteria, such as thermophilic and mesophilic clostridia and especially the phylogenetically deeply-branching SRB *Aquifex pyrophilus* and *Thermodesulfobacterium commune* (references given in Pancost *et al.* (2001)). Notably, new results showed the presence of monoalkylether phospholipids in *Desulfosarcina variabilis* Rütters *et al.*, 2001), a member of the mesophilic SRB genus which is commonly observed in seep deposits (Orphan *et al.*, 2001) and is the predominant bacterial component in the microbial mat studied. This suggests that the non-isoprenoidal ether lipids characterize contributions from *Desulfosarcina/Desulfococcus* SRB living in syntrophic communities with Archaea in methane-related environments.



**Fig. S1** Total ion current chromatograms of lipid fractions from the Black Sea microbial mat. IS = internal standard

Top: total neutral lipids (TMS derivatives). Cr = 2,6,11,15-tetramethylhexadecane (crocetane) (1), PMI = 2,6,10,15,19-pentamethylcosane and unsaturated derivatives (0 to 4 double bonds), 23 = *n*-tricosenes, *ai-15/ai-15* = 1,2-di-O-12-methyltetradecyl (*anteiso*-C<sub>15</sub>)-*sn*-glycerol, Ar = 2,3-di-O-phytanyl-*sn*-glycerol (archaeol), OH-Ar = 2-O-3-hydroxy-phytanyl-3-O-phytanyl-*sn*-glycerol (*sn*-2-hydroxyarchaeol).

Middle: carboxylic acid fraction (methyl esters). Filled circles (numbers) = *n*-alkanoic acids (carbon chain length); *ai-15* = 12-methyltetradecanoic acid (*anteiso*-C<sub>15</sub>). Open circles = *n*-monoenoic C<sub>16</sub>- and C<sub>18</sub>-acids, respectively.

Bottom: hydrocarbons after HI/LiAlH<sub>4</sub> treatment of the polar lipid fractions (2): *ai-15* = 3-methyltetradecane; Ph = 3,7,11,15-tetramethylhexadecane (phytane); 0, 1, 2 = biphytane (= 0), and mono- (= 1) and dicyclic (= 2) derivatives thereof.

**Environmental regulation of anaerobic oxidation of methane  
mediated by ANME-I- and ANME-II- communities:  
a comparative analysis**

Katja Nauhaus<sup>1</sup>, Tina Treude<sup>1</sup>, Antje Boetius<sup>1,2,3</sup>, Martin Krüger<sup>1\*</sup>

Manuscript in preparation

---

<sup>1</sup> Max Planck Institute for Marine Microbiology, Celsiusstrasse 1, D-28359 Bremen, Germany

<sup>2</sup> Alfred Wegener Institute for Polar- and Marine Research, Am Handelshafen 12, D-27515 Bremerhaven, Germany

<sup>3</sup> International University of Bremen, Campusring 1, D-28759 Bremen, Germany

\* For correspondence. E-mail: mkrueger@mpi-bremen.de; Tel.: (+49) 421 2028 736; Fax (+49) 421 2028 790

## Summary

Anaerobic oxidation of methane is one of the major sinks for methane on earth and it is known to be mediated by at least two phylogenetically different groups of Archaea, ANME-I and ANME-II. We present the first comparative *in vitro* investigation of the environmental regulation and physiology of two different methane oxidizing communities dominated by ANME-I or ANME-II, both live in association with sulphate-reducing-bacteria (SRB) of the phylogenetic cluster *Desulfosarcina/Desulfococcus*. The ANME-II dominated sediments from Hydrate Ridge (HR, Cascadia Margin, off Oregon, USA) were compared to microbial mats from the Black Sea (BS) predominantly consisting of ANME-I. The stoichiometric relation of 1:1 between methane oxidation and sulphate reduction was shown for both samples. Methane-dependent sulphate reduction (SR) showed higher cell specific rates for the ANME-II dominated community under similar experimental conditions. Besides sulphate, no other electron acceptor was used for the anaerobic oxidation of methane. Only disproportionation of sulphite and thiosulphate was also performed by ANME-I and ANME-II communities. The processes of AOM and SR could not be uncoupled by selectively stimulating the SRB with potential intermediates like acetate, formate or molecular hydrogen. Also the effective removal of electrons by AQDS, humics or phenazines did not stimulate the activity of the archaeal partner. The process of AOM was completely inhibited if 2-bromoethanesulfonate (BES) a specific inhibitor for methanogens was added. Molybdate, an inhibitor for SRB lead to a complete inhibition in HR samples but only partially inhibited AOM in BS samples. Antibiotics selectively affecting bacteria had no effect on the overall process of methane dependent sulphate reduction. A variation of environmental parameters like sulphate concentration, pH and salinity did not significantly influence the activity of the ANME-I and ANME-II communities within rather broad ranges. However, both communities responded to elevated methane partial pressures with increased substrate turnover, indicating the importance of the prevailing methane availability for the activity of the AOM community. Temperature also influences the intensity of methane fuelled SR. The psychrophilic ANME-II community of HR was most active at low temperatures and was affected by temperatures above 16 °C. The ANME-I community in BS samples had a temperature optimum between 10 °C and 24 °C. The ecological niches of ANME-I and ANME-II seem to be mainly

defined by the availability of methane and sulphate, and thus presumably enable AOM performing microorganisms to thrive in different habitats where those two prerequisites are met.

**Key words:** methane oxidation, gas hydrates, gas seeps, archaea, sulphate reduction, electron transfer



## Introduction

The anaerobic oxidation of methane (AOM) occurs in marine habitats where fluxes of methane coincide with fluxes of sulphate (Hinrichs & Boetius, 2002). Up to 85% of the methane rising from deeper sediment horizons is oxidized within the upper, anoxic part of the sediment, effectively preventing the release of this important greenhouse gas into the atmosphere (Ehalt, 1974; Iversen, 1996). AOM is therefore an important process in the global methane cycle (Crutzen, 1994; Reeburgh, 1996). However, it remains unknown how the process functions in detail and how the high biomass of AOM communities found in some marine environments is maintained by a process yielding only very little free energy (Boetius *et al.*, 2000; Michaelis *et al.*, 2002).

Molecular studies show that the anaerobically methane oxidizing archaea (ANME) so far identified are more or less closely affiliated with the *Methanosarcinales* (Hinrichs *et al.*, 1999; Orphan *et al.*, 2002). Both known ANME groups (I and II) are associated with sulphate-reducing-bacteria (SRB) of the *Desulfosarcina/Desulfococcus* group (Boetius *et al.*, 2000; Michaelis *et al.*, 2002; Knittel *et al.*, 2003). The nature of the cooperation between the two organisms could so far not be elucidated (Sørensen *et al.*, 2001; Nauhaus *et al.*, 2002; Valentine, 2002). According to thermodynamic calculations the amount of free energy available from AOM is crucially dependent on the environmental settings, especially on the methane partial pressure (Zehnder & Brock, 1980; Iversen & Blackburn, 1981). So far only few experimental data are available to determine the effect of variable environmental factors, and their influence on the effectiveness of the process (Valentine & Reeburgh, 2000; Nauhaus *et al.*, 2002). The availability of sulphate in subsurface sediments could also be a major factor regulating methane fluxes to the sea floor. Global climate changes might lead to increase in water temperature, a factor strongly influencing the stability of gas reservoirs such as methane hydrates and therefore also methane availability at continental margins (Paull *et al.*, 1991; Kvenvolden, 1993).

Environmental factors do not only regulate the occurrence and intensity of AOM, they are probably also crucial factors influencing the development of specific AOM communities in different habitats. The phylogenetic diversity at least of the archaeal partners might be an indication for specialized communities in habitats with different environmental conditions.

In the present study we performed laboratory experiments with two samples from different marine environments with phylogenetically different AOM populations. A first set of experiments with sediments from the gas hydrate bearing sediments of Hydrate Ridge (HR; Cascadia margin, USA) dominated by an ANME-II community proved that AOM depends on sulphate as electron acceptor and is influenced by methane availability (Nauhaus *et al.*, 2002). These and additional experiments with sediment slurries from HR were compared to experiments with the recently discovered microbial mats building carbonate reefs at gaseous methane seeps in the anoxic waters of the Black Sea (BS) (Michaelis *et al.*, 2002). These mats are dominated by ANME-I archaea associated with SRB of the same phylogeny (*Desulfosarcina/Desulfococcus* group) as at HR.

With the *in vitro* experiments we are addressing the questions 1) if ANME-I and ANME-II communities have similar activities and stoichiometries of AOM *in vitro*, 2) if the phylogenetically different populations (ANME-I and ANME-II) exhibit physiological differences and 3) how environmental factors influence the activity of both anaerobically methane oxidising communities.

## Results and Discussion

The process of anaerobic oxidation of methane can be mediated by at least two phylogenetic groups of archaea: the ANME-II cluster as well as the ANME-I cluster (Boetius *et al.*, 2000; Michaelis *et al.*, 2002; Orphan *et al.*, 2002). ANME-I and ANME-II communities have now been found in a variety of marine environments, usually associated with the same type of SRB from a branch within the *Desulfosarcina/Desulfococcus* cluster of the Deltaproteobacteria (Knittel *et al.*, 2003; Boetius & Suess, 2003). The first *in vitro* investigations of the activity and stoichiometry of communities dominated by ANME-II were just recently presented (Nauhaus *et al.*, 2002; Girguis *et al.*, 2003). Unexpectedly a whole microbial reef ecosystem formed by ANME-I dominated methanotrophic mats in permanently anoxic waters of the Black Sea was discovered (Michaelis *et al.*, 2002). The possibility of a build up of high biomasses of methanotrophic organisms under anoxic conditions has been debated for many years (Hartgers *et al.*, 1994, Nisbet & Sleep, 2001; Hinrichs & Boetius, 2002). We were able to use this living model system for a presumably ancient form of life for the first physiological investigations of an ANME-I community.

Just by visual inspection of the two AOM communities studied, derived from the surface sediments above gas hydrate impacted by fluid flow at Hydrate Ridge (Cascadia Margin, OR) and the microbial reefs from the anoxic part of the Crimea margin (Black Sea), a variety of differences become obvious. In HR sediments, the ANME-II/DSS consortia occur in high abundance as small aggregates of a few hundred cells dispersed within the sediment. The highest abundance is found in a zone of one to four centimetres directly below the seafloor, characterized by high methane fluxes from below. In this zone above gas hydrates, some of the highest densities of sulphate reducers and highest rates of AOM and SR known from marine environments have been found (Boetius *et al.*, 2000; Boetius & Suess, 2003; Treude *et al.*, 2003). Due to the high fluxes methane is available in excess in both environments (Michaelis *et al.*, 2002; Boetius & Suess, 2003) However, at high rates of AOM sulphate becomes rapidly depleted within sediments because of the comparatively slow diffusive flux (Luff & Wallmann, 2003). Wherever sulphate is mixed into the sediments e.g. through the dwelling activity of the chemosynthetic clams, numbers of consortia and rates of AOM increase over a broader area and are not restricted to sediments below mats of the giant sulphide oxidizing bacteria *Beggiatoa*. The permanently

anoxic bottom waters of the Black Sea do not provide conditions appropriate for metazoan life requiring oxygen. But the anaerobic microbial mats are enabled to expand into the water column and profit from advective sulphate flux due to bottom water currents. Increase in  $\text{HCO}_3^-$  and  $\text{HS}^-$  concentrations due to AOM activity and the resulting increase in alkalinity supports carbonate precipitation. The anoxic conditions in the Black Sea allow carbonate precipitates associated with microbial mats to build structures of up to 4 m high into the water column with a diameter of up to 1 m (Michaelis *et al.*, 2002). The *in vitro* experiments were carried out to test potential physiological differences between ANME-II and ANME-I communities, as well as to further analyse which environmental parameters are significantly influencing AOM activity.

*Does in vitro AOM differ between ANME-I and ANME-II communities?*

Strictly anoxic incubations of homogenized microbial mat dominated by ANME-I cells showed continuous sulphide production in the presence of methane and sulphate. In controls incubated with nitrogen instead of methane, significantly less sulphide production occurred. An increase in sulphide concentration from  $<1$  mM at the beginning of an experiment to about 12 mM took on average 60 days with 0.2 ml of fresh material of the ANME-I mat from the BS under methane saturation (ca. 1.3 mM at 1 atm). Previous experiments with ANME-II dominated samples from HR showed the same results regarding the time course of the experiment (Nauhaus *et al.*, 2002).

Methane dependent sulphate reduction in the BS mats were on average  $41 \pm 16$  ( $n = 38$ )  $\mu\text{mol d}^{-1} \text{g}_{\text{dw}}^{-1}$ , ranging from 15 to 81  $\mu\text{mol d}^{-1} \text{g}_{\text{dw}}^{-1}$ . Sediment slurries from HR sediments revealed an SR of  $2.5 \pm 0.3 \mu\text{mol d}^{-1} \text{g}_{\text{dw}}^{-1}$ . To compare the environmental activity in both incubations, rates were calculated per gram dry weight of sediment (HR) or mat (BS). However, for a comparison on the basis of specific cell activity, this is misleading because the biomass density in the HR sediment slurries is much lower than in the mats which are mainly composed of cells. The investigated sediment horizon (1 – 4 cm) of the HR samples contained on average  $9 \times 10^7$  consortia per gram dry weight of sediment. An average consortium consists of approx. 100 archaeal cells of the ANME-II group and 200 SRB cells, with a diameter of about 0.5  $\mu\text{m}$  (Boetius *et al.*, 2000). Comparing methane

driven sulphate reduction per SRB cell revealed that HR samples ( $20 \text{ mmol d}^{-1} \text{ g [cell dry mass]}^{-1}$ ) are almost ten times more active than SRB in BS mat samples ( $1 \text{ mmol d}^{-1} \text{ g [cell dry mass]}^{-1}$ ). It is however so far not known if all the cells in the consortium and in the mat are equally active. Cells that have no direct contact with the other partner might not be active or to a lesser extent than cells with direct contact. Due to the low energy yield of the process and the presumably low concentration of the intermediate, the diffusive loss even over a small distance of a few  $\mu\text{m}$  is significant (Boone *et al.*, 1989). Therefore, many cells are probably not within the narrow optimal concentration range required for sufficient energy conservation (Sørensen *et al.*, 2001).

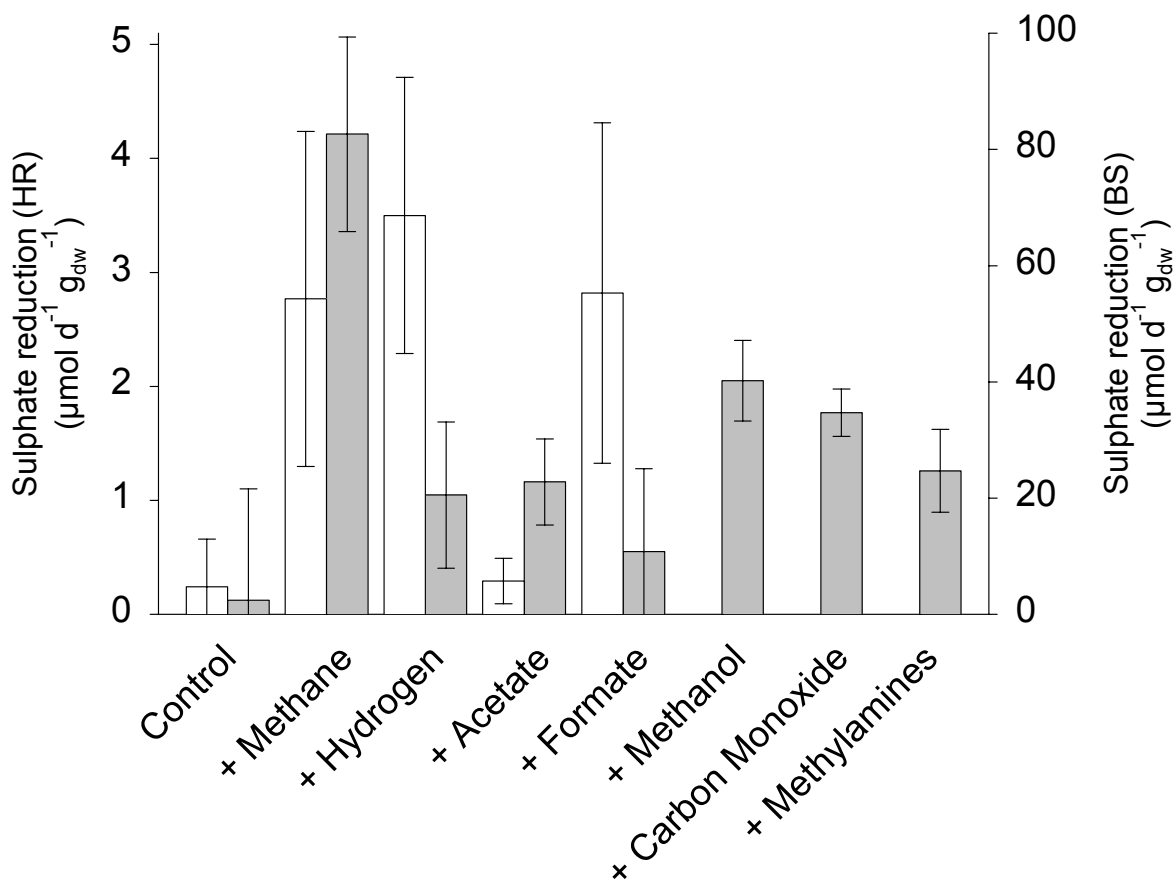
The *in situ* hydrostatic pressures at the investigated sites (70 bar at HR and 20 bar at BS) in general would not lead to physiological effects in microbes. However, these hydrostatic pressures considerably affect the *in situ* availability of methane. At atmospheric pressure only approx. 1.3 mM methane are dissolved, depending on temperature and salinity (Yamamoto *et al.*, 1967). Dissolution of the gas increases linearly with pressure. Free gas ebullition was observed both at the microbial reefs of the Black Sea and at Hydrate Ridge. This indicates methane saturation at these sites with theoretical concentrations of 2.33 MPa (39.86 mM) and 7.9 MPa (138 mM) for BS and HR, respectively. Increasing the methane partial pressure *in vitro* from 0.1 MPa to 1.1 MPa (15 mM) increased the methane driven sulphate reduction rate five fold in HR (Nauhaus *et al.*, 2002) and two fold in BS samples. Simultaneous measurements of methane oxidation and sulphide production from the reduction of sulphate revealed a molar ratio of 1:1 between the two processes (methane oxidation and sulphate reduction) for both communities (for HR samples published in Nauhaus *et al.*, 2002).

*Are there different electron donors for AOM and SR of ANME-I and ANME-II communities?*

Whereas methane clearly fuels the activity of ANME-I and ANME-II communities, higher alkanes, ethane, propane and butane were not oxidised coupled to sulphate reduction. In contrast, the addition of these compounds in concentrations  $>10 \text{ mM}$  resulted in an inhibition of AOM of both ANME-I and ANME-II communities (data not shown). In Nauhaus *et al.* (2002) we have shown that the addition of a number of different exogenous

electron donors other than methane (acetate, formate, molecular hydrogen and methanol) did not stimulate sulphate reduction in the absence of methane in HR sediment slurries. These data were obtained within a one week incubation to minimize the enrichment of SRB on the added compounds. In additional experiments we could also show that neither carbon monoxide nor methylamines have stimulating effects on SR compared to methane alone (Fig. 1). The same experiments were performed with the ANME-I dominated BS mats using acetate, formate and molecular hydrogen as electron donors. While the rates with acetate were as low as in the control experiment without any electron donor, with formate and molecular hydrogen sulphide production was in the same range as with methane (Fig. 1). In our simultaneously performed isolation attempts with the BS mats, we observed enrichments of different SRB with hydrogen and formate within weeks. None of these isolates however belonged to the *Desulfosarcina/Desulfococcus* group associated with ANME-I. If the SRB partner relies on the substrate supplied by the methanogen operating in reverse, it should immediately respond with higher sulphate reducing activity than with methane as an indirect electron donor, if this substance is supplied in high, but non-inhibitory concentrations. Even though sulphate reduction rates were not in all cases significantly lower than with methane as electron donor, they never exceeded methane fuelled sulphate reduction. Even though the experiments with the potential intermediates were only performed for one week, it is most likely that the observed high sulphate reduction rates are due to the enrichment of other SRB.

Also the possibility of electrons being transferred directly between the archaeal and the SRB partner alternatively to the exchange of H<sub>2</sub> or a C-compound has been discussed for the AOM consortia (Sørensen *et al.*, 2001; Nauhaus *et al.*, 2002). Syntrophy based on electron transfer has previously been reported for other anaerobic reactions (Seeliger *et al.*, 1998; Spormann & Widdel, 2000; Schink & Stams, 2001). To test this possibility, compounds that are able to capture electrons (phenazines, AQDS and humic acids) were added to incubations with sediment slurries from Hydrate Ridge at atmospheric methane partial pressure. If the process of AOM would depend on a transfer of electrons to the SRB partner, the added compounds would replace the function of the SRB. In this case AOM should not be affected, however, methane driven sulphate reduction should decline. We used radiolabelled methane in tracer quantities and determined the production of radio-



**Fig. 1** Effect of different possible intermediates of AOM as electron donors for the SRB partner in a syntrophic relation to oxidize methane anaerobically ( $\mu\text{mol d}^{-1} \text{g}_{\text{dw}}^{-1}$ ) in HR<sup>\*1</sup> (■) and BS (□) samples, in comparison to sulphate reduction with methane and in controls without electron donor, mean values  $\pm$  sd ( $n = 0\ 3$ ). Molecular hydrogen, acetate, formate, methanol<sup>\*2</sup>, carbon dioxide<sup>\*2</sup>, methylamines<sup>\*2</sup>.

<sup>\*1</sup> Partially shown in Nauhaus et al. (2002)

<sup>\*2</sup> not determined for BS samples

labeled carbon dioxide. However, with each of the added compounds the oxidation of methane to  $\text{CO}_2$  as well as the reduction of sulphate was completely inhibited (Table 1). Phenazines play an important role in membrane bound electron transport, but they might also have toxic effects (Abken *et al.*, 1998; Ingram & Blackwood, 1970). Even though Straub & Schink (2003) showed that AQDS may serve as electron shuttle for iron reducing bacteria, the redox conditions in the incubations might change upon the addition of AQDS or humics making AOM impossible to occur (Hernandez & Newman 2001; Shuy *et al.*,

2002). In summary, our experiments did not provide evidence for a methanogenic substrate acting as an intermediate in the reverse process, or for electrons being transferred between the two partners. These results together with the observation that archaeal cells of the ANME-I cluster (rarely of the ANME-II cluster) occur as single cells or as aggregations in AOM environments (Orphan *et al.*, 2002; Knittel, pers. comm.) suggests the possibility of both processes being carried out by one organism. Recently methyl-coenzyme M reductase, the terminal enzyme in methanogenesis and the methanogen specific cofactor  $E_{430}$  have been detected in the microbial mats from the Black Sea (Krüger *et al.*, 2003). Furthermore Hallam *et al.* (2003) found gene sequences of the *mcrA* subunit of the same enzyme in sediments with AOM activity which they assign to the ANME-II group. Because of these evidences and the fact, that the sulphate-reducing archaeon *Archaeoglobus fulgidus* possesses genes and enzymes for methanogenesis (Klenk *et al.*, 1997) it seems possible that the ANME groups comprise the genes for both pathways.

**Table 1** Effect of different electron capture compounds on AOM activity in the presence or absence of sulphate ( $n = 3 - 5$ ) (HR sediment)

Compound added	Reduction of the compound	Methane oxidation (without sulphate)	Methane oxidation (with sulphate)
	(chemical analysis)	(Oxidation of $^{14}\text{C-CH}_4$ to $\text{CO}_2$ )	
AQDS <sup>1</sup>	Yes	No	No
AQDS <sup>1</sup> with Fe <sup>2</sup>	Yes	No	No
Humic acids	n. d. <sup>4</sup>	No	No
Phenazine-methosulphate	n. d. <sup>4</sup>	No	No
Phenazine-ethosulphate	n. d. <sup>4</sup>	No	No
only methane (control)	-	No	Yes

<sup>1</sup> AQDS: Anthroquinone-disulfonate; <sup>2</sup> Fe<sup>0</sup> added as possible electron sink to reoxidise AQDS, if the SRB are not able to take electrons from AQDS

<sup>4</sup> n. d.: not determined



*Is sulphate the only electron acceptor for methane oxidation?*

Nitrate, sulphur, ferric iron, iron citrate and manganese (IV) oxide were added to anoxic, sulphate free incubations of replicate HR sediment slurries containing an ANME-II community. The indigenous microbial populations reduced all of the added compounds. However, the reduction was in no case coupled to the oxidation of methane as was shown by measuring the formation of  $^{14}\text{CO}_2$  from the oxidation of radio labelled methane (Table 2). HR samples as well as the microbial mats from the Black Sea were able to oxidize methane with sulphate concentrations from 10 to 100 mM (data not shown). Without sulphate no AOM activity could be observed, showing once more the dependency on both, the electron donor methane and the electron acceptor sulphate. Because methane dependent sulphate reduction rates were not significantly lower with 10 than with 28 mM sulphate or more the minimum concentration required to drive AOM is somewhere between 10 mM and  $>0$  mM sulphate. Interestingly, both samples (HR and BS) revealed the ability to disproportionate thiosulphate or sulphite. Rates were calculated from the amount of sulphide produced within 100 days of incubation, during which sulphite and thiosulphate were added in small amounts several times to prevent toxicity. Sulphide production with sulphite was highest in both samples (HR = 1.96, BS = 81.63  $\mu\text{mol d}^{-1} \text{g}_{\text{dw}}^{-1}$ ,  $n = 3$ ), even higher than with methane and sulphate (HR = 0.97, BS = 47.29  $\mu\text{mol d}^{-1} \text{g}_{\text{dw}}^{-1}$ ), this is probably due to the higher yield of free energy from this process. Sulphide production from thiosulphate was in a similar range as with sulphate (HR = 1.01, BS = 36.81  $\mu\text{mol d}^{-1} \text{g}_{\text{dw}}^{-1}$ ). However, dilutions to enrich the organisms under disproportionation conditions lead to a complete loss of activity. This is probably due to the presumed inability of marine bacteria to couple disproportionation to energy conservation, nevertheless disproportionation is usually not an unimportant process in marine environments (Jørgensen & Bak, 1991). In conclusion, no oxidation of methane could be observed in the presence of any other electron acceptor if sulphate was absent. However, the ability of both the ANME-I and the ANME-II communities to oxidize methane by a disproportionation of sulphite and thiosulphate is a very important result with regard to the origin of anaerobic methane oxidation. The geological time at which the oxidation of the oceans on early earth began is strongly debated, especially with regard to the concentrations

of sulphate in seawater (Habicht *et al.*, 2002). Knowing the regulation of methane oxidation by sulphate availability is critical to understanding the early cycling of methane on earth.

**Table 2** Reduction of different electron acceptors in HR sediment and their coupling to AOM ( $n = 3$ )

<b>Compound added</b>	<b>Reduction of the electron acceptor</b> (measurement of the concentration of reduced compound)	<b>Simultaneous oxidation of methane</b> (measurement of the oxidation of $^{14}\text{CH}_4$ to $^{14}\text{CO}_2$ )
Nitrate	Yes	No
Mn(IV) ( $\text{MnO}_2$ )	Yes	No
Fe(III) (ferrihydrite)	Yes	No
Fe(III) (ferric citrate)	Yes	No
Sulphur	n. d. <sup>1</sup>	No
$\text{Fe}^0$	n. d. <sup>1</sup>	No
Fumarate	Yes	No
Sulphate (as control)	Yes	Yes

<sup>1</sup> n. d.: not determined

#### *Which environmental parameters are controlling AOM?*

The process of anaerobic oxidation of methane is effective in preventing emission of the green house gas methane to the atmosphere. There are indications that the intensity of the process is correlated with certain environmental parameters, mainly methane and sulphate fluxes and the availability of other hydrocarbons (Joye *et al.*, 2003; Treude *et al.*, 2003). Methane partial pressure is influenced by the methane flux from subsurface reservoirs which is influenced by temperature and hydrostatic pressure (Paull *et al.*, 1991; Kvenvolden, 1993). To estimate the effect of climate changes and consequential temperature shifts on the activity of the “methane biofilter” provided by AOM, it is essential to know the responses of the organisms towards these and other environmental parameters.

Even though the respective in situ temperatures differ only by 4 °C (Tab. 3), the HR community has a psychrophilic temperature profile whereas the BS samples are mesophilic,

with highest methane driven sulphate reduction activity between 16 and 24 °C (Fig. 2). Since the rates at 12 °C (the optimum for HR) were considerably high also in the ANME-I community, all incubations with both samples (HR and BS) were performed at 12 °C, to

**Table 3** In situ values of environmental parameters at HR and at the methane seeps in the BS

Parameter	Hydrate Ridge	Black Sea
Pressure [bar]	80 <sup>1</sup>	23 <sup>1</sup>
Temperature [°C]	4 <sup>2</sup>	8 <sup>2</sup>
Salinity [‰]	33 <sup>3</sup>	22 <sup>3</sup>
pH	8.25 <sup>4</sup>	8.5 <sup>2</sup>
Sulphate [mM]	28 <sup>4</sup>	17 <sup>3</sup>

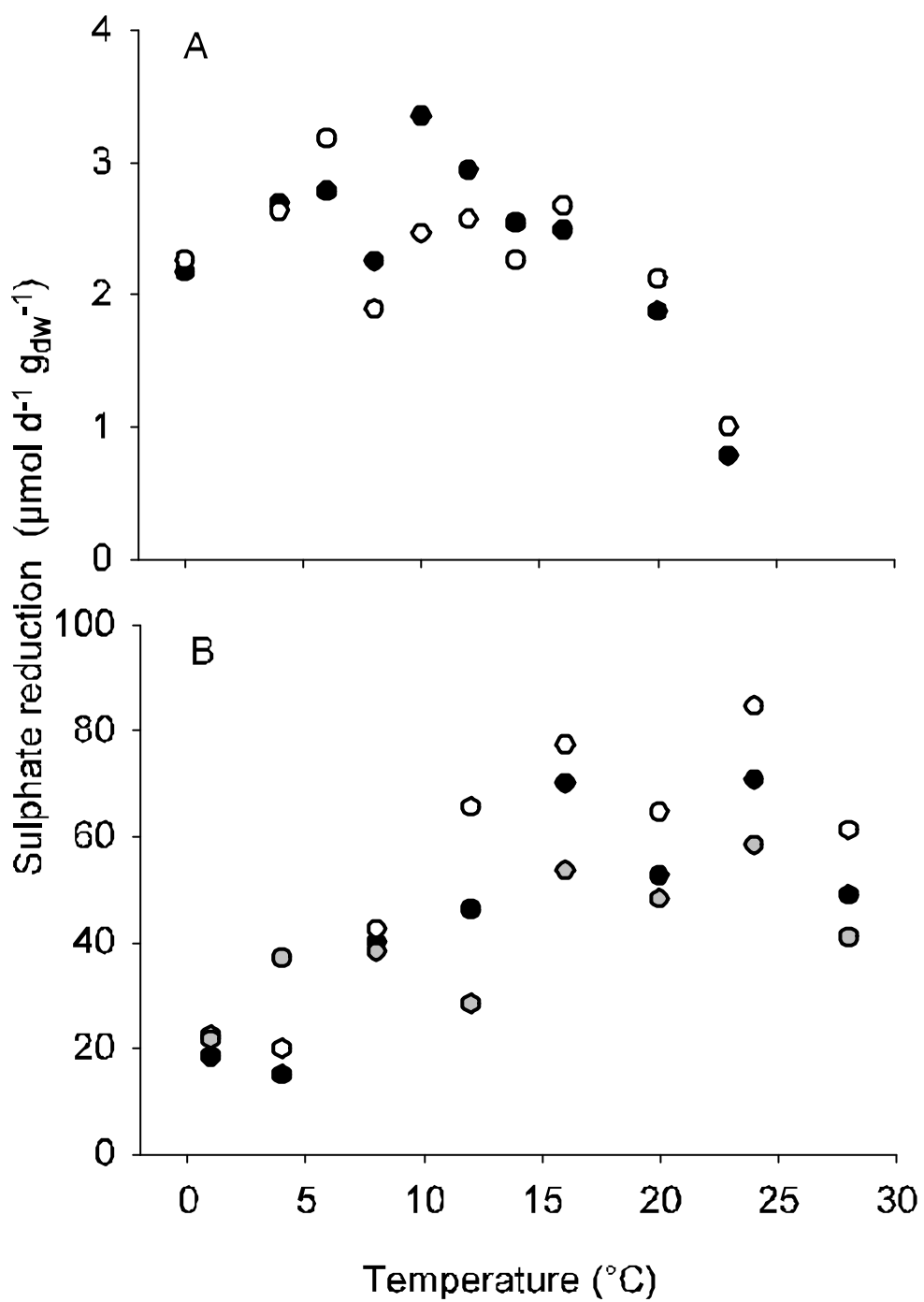
<sup>1</sup> calculated; <sup>2</sup> shipboard measurements; <sup>3</sup> laboratory measurements;

<sup>4</sup> Linke & Suess (2000)

keep the experiments standardised. Small temperature differences *in situ* may have a selective effect on the type of AOM community that establishes in a certain habitat.

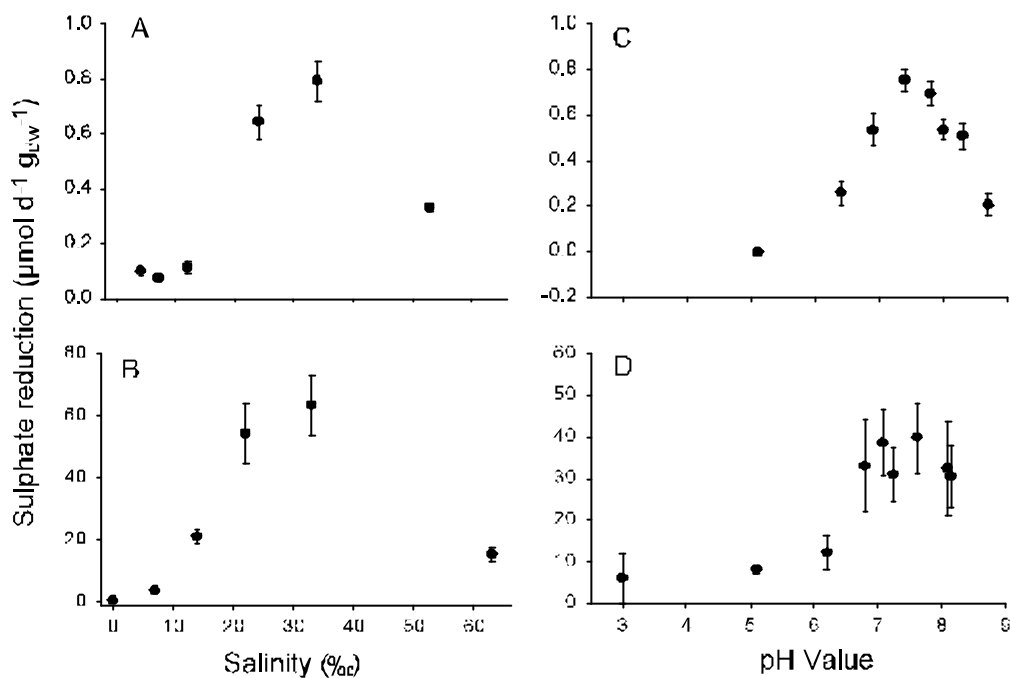
Samples from both study sites were incubated at different salinities ranging from 0 to 63‰. Comparable SRR for both ANME communities were achieved with 22 and 33‰, showing the adaptation of the organisms to the marine environment, but no advantage of either population under their *in situ* conditions (Fig. 3A, B). With respect to the effect of pH changes, ANME-II from HR sediments had a distinct maximum of sulphate reduction rates at pH 7.4 ( $0.75 \mu\text{mol d}^{-1} \text{g}_{\text{dw}}^{-1}$ ) but decreased below pH 6.9 and above pH 8 to  $0.53 \mu\text{mol d}^{-1} \text{g}_{\text{dw}}^{-1}$  (Fig. 3C, D). The pH tolerance was broader for the samples from the BS ranging from pH 6.8 to 8.1 (higher values not tested).

A strong effect on methane driven sulphate reduction was obtained by varying the methane partial pressure. Significantly higher sulphate reduction rates were observed when the methane partial pressure was raised from 0.1 to 1.1 MPa. The HR samples responded with a 4 to 5 fold increase (Nauhaus *et al.* 2002), whereas sulphate reduction in BS mats only doubled from 54 to  $107 \mu\text{mol d}^{-1} \text{g}_{\text{dw}}^{-1}$ . Because of technical limitations we could not



**Fig. 2** Methane dependent sulphate reduction ( $\mu\text{mol d}^{-1} \text{g}_{\text{dw}}^{-1}$ ) at different temperatures in HR samples (A), 2 replicates, and BS mats (B), 3 replicates.

determine methane saturation values and conduct kinetic calculations of methane turnover for AOM (for a detailed discussion of this aspect see Nauhaus *et al.*, 2002).



**Fig. 3** Methane dependent sulphate reduction ( $\mu\text{mol d}^{-1} \text{g}_{\text{dw}}^{-1}$ ) at different salinities (A, B) and different pH values (C, D) for HR (A, C) and BS (B, D) samples, mean values  $\pm$  sd ( $n = 3$ ).

*Are there physiological differences in response to specific inhibition of AOM/SR and the SRB partner by ANME-I, ANME-II populations?*

If the oxidation of methane with sulphate is not carried out in one step but in subsequent reactions, it should theoretically be possible to uncouple methane oxidation from sulphate reduction by using specific inhibitors for the two processes. If these reactions are not carried out by one cell, but are separated between the two partners, archaea and bacteria, it might also be possible to study AOM and SR after inhibition of either partner.

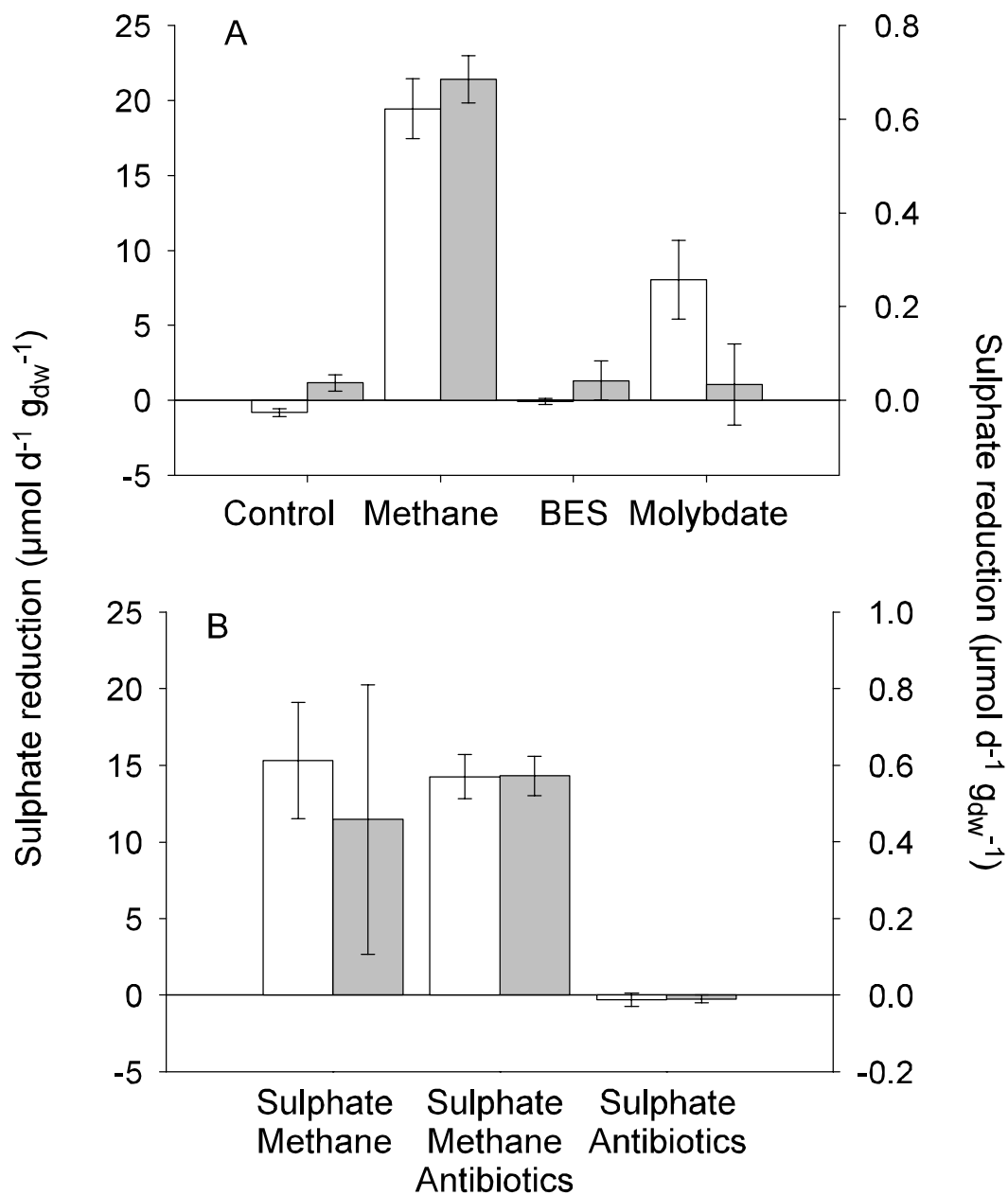
Molybdate a specific inhibitor for sulphate reduction and 2-bromoethane-sulphonate (BES) an inhibitor for methanogenesis were added to triplicate incubations with sulphate and methane. With BES, methane driven sulphate reduction of both ANME-I and ANME-

II communities was completely inhibited. Molybdate also inhibited ANME-II in HR samples completely, whereas in BS samples the methane driven SR decreased to less than half the rate as in incubations without molybdate (Fig. 4A). Hydrogen concentrations increased in both samples with BES and without inhibitors to approx. 100 ppmv within the first 8 days of the incubation. Between day 9 and 11 it dropped below the detection limit (<5 ppmv) and stayed that low. The hydrogen is most probably consumed by developing hydrogen utilizing SRB. Only in incubations with molybdate, hydrogen was not consumed and reached concentrations of more than 800 ppmv. HPLC and IC analysis of supernatants of incubations with and without inhibitors did not reveal an accumulation of any other substances possibly involved as intermediate in the process of AOM.

Inhibition studies have to be interpreted carefully, since there are often uncertainties regarding necessary concentrations and the resulting specificity. The inhibition of each process separately by a specific inhibitor (BES for methanogens and molybdate for SRB) completely stopped AOM. This is however, no proof for syntrophy or symbiotic association between the two partners. A complete inhibition would also be observed if both, methane oxidation and sulphate reduction, are occurring within one organism. BES is a structural analogue to coenzyme M, consequently a specific inhibitor of methanogens (Oremland & Capone, 1988). However, it is halogenated and thus a chemically reactive electrophile, and the application of higher concentrations will probably lead to unspecific inhibitions of other processes. The complete inhibition of AOM by BES at concentrations of >1 mM indicates the biochemical relatedness of methanogenesis and anaerobic oxidation of methane, thus strengthening the reversal of methanogenesis as proposed earlier (Hoehler *et al.*, 1994). Indeed, in a recent study with the BS samples first biochemical evidence for this hypothesis was found (Krüger *et al.*, 2003).

Molybdate on the other hand inhibits the activation of sulphate to APS in sulphate reduction. Hydrogen utilizing SRB were effectively inhibited, this is evident from the accumulation of hydrogen only in those experiments with molybdate. However, molybdate might have side effects on a variety of organisms and processes especially when applied in marine environments (Oremland & Capone, 1988). The incomplete inhibition of the ANME-I community of the BS samples by molybdate might be explained by adsorption of molybdate onto the EPS-material, in which the mat-microorganisms are embedded, thus

preventing the build-up of inhibitory concentrations. The SRB in the AOM mediating syntrophy seem to be different from conventional hydrogen utilizing SRB, because those were effectively inhibited by molybdate as shown by the lack of hydrogen consumption in molybdate amended incubations.



**Fig. 4** Effect of specific inhibitors, 2-bromoethanesulfonate (BES) and molybdate (A) and the antibiotics kanamycin and ampicillin (B) on methane dependent sulphate reduction ( $\mu\text{mol d}^{-1} \text{g}_{\text{dw}}^{-1}$ ) in HR (■) and BS (□) samples (mean values  $\pm$  sd,  $n = 3$ ).

The antibiotics kanamycin and ampicillin act specifically against Bacteria and consequently should not affect archaea (Dawson *et al.*, 1986). The methane driven sulphate reduction by ANME-I and ANME-II communities, however, was not affected by these



antibiotics (Fig. 4B). The proper function of these antibiotics against SRB was confirmed by incubating both samples (HR and BS) with molecular hydrogen and carbon dioxide but without sulphate. In the presence of antibiotics, methanogens were enriched, whereas without antibiotics SRB growing as acetogens appeared. However, these antibiotics, as most of them, do only affect growing cells. The AOM mediating organisms are presumed to grow very slowly, therefore their catabolism is most probably not halted by antibiotics.

#### *Environmental regulation of AOM*

Can we hypothesise that ANME-I communities occupy a different ecological niche than ANME-II communities? The range of data sets available today (Hinrichs & Boetius, 2002; Michaelis *et al.*, 2002; Orphan *et al.*, 2002; Teske *et al.*, 2002, Boetius & Suess, 2003; Knittel *et al.*, 2003, Treude *et al.*, 2003) suggests that the co-occurrence of methane and sulphate is the major environmental factor defining the ecological niche occupied by anaerobic methane oxidizing communities. Within this niche we still do not know which factors select for which type of communities. We could not find a clear relation between phylogenetic affiliation and specific environmental parameters like temperature, pressure and methane concentration. Overmann & van Gemerden (2000) discussed the same aspect for phototrophic consortia. These organisms occupy a distinct niche with low light intensities and low sulphide concentrations (Overmann *et al.*, 1998) but exhibit a variety of morphotypes in geographically different habitats also with different phylogenetic affiliations at least of the phototrophic partner. Also for other closely related organisms in one habitat distinct ecological niches were observed or postulated (Moore *et al.*, 1990; Rowan & Knowlton, 1995). So far, we do not know of any environment where only one of the two known anaerobic methane oxidizers occurs. However, quantitative analyses of the community composition clearly show a dominance of either one or the other group, indicating yet unknown environmental selection pressures.

## Methodology

### *Origin and storage of samples*

Sediment samples were taken during RV SONNE cruise SO-148/1 in August 2000 at the crest of the southern Hydrate Ridge, NE Pacific (44°34' N, 125°09' W; 780 m water depth) in areas of active gas seeping using a video-guided multiple corer (Linke & Suess, 2000; Treude *et al.*, 2003). For the experiments the most active samples from 14 cm sediment depth were used. The sediment samples were stored anoxically in glass bottles at 5 °C until further processing in the laboratory.

Microbial mats were obtained during RV Prof. LOGACHEV cruise in July 2001 in anoxic waters of the NW Black Sea shelf (44°46'N, 31°60'E), in a water depth of 230 m (Michaelis *et al.*, 2002). Mat pieces were taken with the robot arm of the German submersible JAGO and placed into a barrel filled with anoxic *in situ* water, which was then closed and transported to the surface. On board the samples were transferred into glass bottles, sealed with butyl-rubber stoppers and stored at 8 °C under an atmosphere of methane or nitrogen until further processing.

### *Anoxic incubations*

If not stated otherwise experiments were carried out in glass tubes (20 ml) sealed with butyl-rubber stoppers and screw caps. For HR 3 ml of sediment slurry with 9 ml artificial seawater medium (Widdel & Bak, 1992) were used as described in Nauhaus *et al.* (2002). To obtain homogeneous samples of microbial mat from the Black Sea, pieces of mat material were whisked in a bowl using a small fork, yielding a granular suspension. Aliquots of 0.2 ml mat suspension were taken in 2 ml cut-off syringes and incubated in 12 ml artificial seawater medium prepared after Widdel & Bak (1992). Salinity and sulphate concentrations were adjusted to the respective *in situ* conditions 33‰ and 28 mM for HR samples, and 22‰ and 16 mM for BS samples. All manipulations were performed under an atmosphere of N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (90/10 [v/v]) in an anoxic glove chamber (Mecaplex). The headspace of the incubation tubes consisted either of methane (100%) or of nitrogen/carbon

dioxide (90/10 [v/v]) in control experiments. Triplicate tubes were incubated horizontally at 12 °C and gently shaken once per day to facilitate mixing of methane and sulphate.

Samples for chemical analysis were withdrawn with hypodermic needles and plastic syringes pre-flushed with N<sub>2</sub> through the butyl rubber stoppers.

In experiments for the simultaneous measurements of sulphide and methane to determine the AOM stoichiometry only 70% of the gas phase contained methane, the remaining 30% were N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (90/10 [v/v]) or He (100%).

Dry weight of sediment and mat was determined after drying at 70 °C for 48 h. Sulphate reduction rates were calculated per gram dry weight (g<sub>dw</sub>) of sediment or mat material for HR and BS samples, respectively.

#### *Manipulations for experiments*

As potential intermediates we added the following final concentrations: acetate (10 mM), formate (15 mM), methanol (10 mM), methylamines (10 mM), molecular hydrogen, carbon monoxide and methane (each 0.1 MPa (1 atm) in the headspace). Phenazine – methosulphate and - ethosulphate, (0.2 mM each), AQDS (1 – 5 mM), humic acids (commercially available mixture of soil humics, Sigma Aldrich; 10 mg/12 ml) were added as electron capture substances. As alternative electron acceptors sulphur (approx. 50 mg/12 ml), ferrihydrate (7.1 mM; preparation after Schwertmann & Cornell, 1991, modified after Jäckel, 1997), nitrate (5 mM), Fe-citrate (30 mM), fumarate (10 mM) and manganese oxide (5 mM) were used. Only ferrihydrate was added already during the medium preparation. For disproportionation experiments thiosulphate (5 mM) and sulphite (1 mM, subsequent additions during the incubation) were supplied. For all experiments on alternative electron acceptors sulphate-free medium was used. The effect of antibiotics was tested with ampicillin and kanamycin (300 mg/l each). Specific inhibitors for sulphate-reducing bacteria, Na-molybdate (100 mM) and for methanogens, 2-bromoethanesulphonate (1 mM) were added. All substances added were taken from anoxic sterile stock solutions and added after autoclaving the medium.

To obtain different pH values, increasing amounts of sterile HCl or NaHCO<sub>3</sub> were added to 50 ml aliquots of medium. The pH determination took place after flushing an

additional tube with methane, to account for the pH change due to CO<sub>2</sub> loss. As controls samples were incubated without methane in all experiments unless indicated otherwise.

### *Analytical procedures*

Sulphide as the product of the methane dependent sulphate reduction was determined using the formation of copper sulphide (Cord-Ruwisch, 1985) or the methylene blue assay (Aeckersberg *et al.*, 1991). Methane was determined using a GC 14B gas chromatograph (Shimadzu) as described in Nauhaus *et al.*, (2002). Additionally, rates of AOM in some experiments (methane oxidation with alternative electron acceptors and addition of electron capture substances) were also determined via the conversion of <sup>14</sup>CH<sub>4</sub> to <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> as described in Treude *et al.*, 2003; Iversen & Blackburn, 1981).

The formation of Fe<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, and the disappearance of nitrate were followed using commercially available test stripes (Merck, Darmstadt, Germany).

The pH was measured using a pH-electrode (Type 464, Knick, Berlin, Germany).

Salinity was determined using a refractometer.

Molecular hydrogen measurements were performed using a GC equipped with a reductive gas analyser as described in Hoehler *et al.* (1998).

HPLC analysis of supernatants for short chain fatty acids was carried as described in Rabus *et al.* (1996).

## **Acknowledgements**

We thank the officers, crew and shipboard scientific party of RV SONNE during expedition SO-148/1 and of RV Prof. LOGACHEV and the JAGO team during the Black Sea cruise in summer 2001 for excellent support. We greatly acknowledge Ramona Appel, Imke Müller, Niko Finke and Melanie Albrecht for technical assistance. We thank Friedrich Widdel for support and fruitful discussions throughout the work and preparation of the manuscript. This study was made possible by the programs TECFLUX II (Tectonically induced Fluxes, FN 03G0148A), Ghostdabs (Gas Hydrates: Occurrence, Stability, Transformation, Dynamic, and Biology in the Black Sea), and MUMM (Mikrobielle Umsatzraten von Methan in gashydrathaltigen Sedimenten, FN 03G0554A) supported by the Bundesministerium für Bildung und Forschung (Germany). Further support came from the Max-Planck-Gesellschaft (Germany). This is publication GEOTECH-XXX of the program GEOTECHNOLOGIEN of the BMBF and the DFG, and publication XXX of the GHOSTDABS project of the University of Hamburg, Germany.

## References

- Abken, H.-J.; Tietze, M.; Brodersen, J.; Bäumer, S.; Beifuss, U.; Deppenmeier, U. (1998) Isolation and characterization of methanophenazine and function of phenazines in membrane-bound electron transport of *Methanosarcina mazei* Gö1. *Journal of Bacteriology* **180**: 2027-2032.
- Aeckersberg, F.; Bak, F.; Widdel, F. (1991) Anaerobic oxidation of saturated hydrocarbons to CO<sub>2</sub> by a new type of sulfate-reducing bacterium. *Archives of Microbiology* **156**: 5-14.
- Boetius, A.; Ravensschlag, K.; Schubert, C. J.; Rickert, D.; Widdel, F.; Gieseke, A. *et al.* (2000) A marine microbial consortium apparently mediating anaerobic oxidation of methane. *Nature* **407**: 623-626.
- Boetius, A. & Suess, E. (2003) Hydrate Ridge: a natural laboratory for the study of microbial life fueled by methane from near-surface gas hydrates. accepted
- Boone, D.R.; Johnson, R.L.; Liu, Y. (1988) Diffusion of the interspecies electron carriers H<sub>2</sub> and formate in methanogenic ecosystems and its implications in the measurement of Km for H<sub>2</sub> or formate uptake. *Applied and Environmental Microbiology* **55**: 1735-1741.
- Cord-Ruwisch, R. (1985) A quick method for the determination of dissolved and precipitated sulfides in cultures of sulfate-reducing bacteria. *Journal of Microbiological Methods* **4**: 33-36.
- Crutzen, P.J. (1994) Global Budgets for non-CO<sub>2</sub> green house gases. *Environmental Monitoring and Assessment* **31**: 1-15.
- Dawson, R. M. C.; Elliot, D. C.; Elliot, W. H.; Jones, K.M. (1986) Data for Biochemical Research. 3<sup>rd</sup> ed. Oxford Science Publications.
- Ehalt, D. H. (1974) The atmospheric cycle of methane. *Tellus* **26**: 58-70.
- Girguis, P.R.; Orphan, V.J.; Hallam, S.J.; DeLong, E.F. (2003) Growth and methane oxidation rates of anaerobic methanotrophic Archaea in a continuous-flow bioreactor. *Applied and Environmental Microbiology* **69**: 5472-5482.
- Habicht, K.S.; Gade, M.; Thamdrup, B.; Berg, P.; Canfield, D.E. (2002) Calibration of sulfate levels in the Archaean Ocean. *Science* **298**: 2372-2374.

- Hallam, S.J.; Girguis, P.R.; Preston, C.M.; Richardson, P.M.; DeLong, E.F. (2003) Identification of methyl coenzyme M reductase A (*mcrA*) genes associated with methane-oxidizing Archaea. *Applied and Environmental Microbiology* **69**: 5483-5491.
- Hartgers, W.S.; Sinninghe Damsté, J.S.; Allan, J.; Hayes, J.M.; Deleeuw, J.W. (1994) Evidence for only minor contributions from bacteria sedimentary organic-carbon. *Nature* **369**: 224-227.
- Hernandez, M. E. & Newman, D. K. (2001) Extracellular electron transfer. *Cellular and Molecular Life Sciences* **58**: 1562-1571.
- Hinrichs, K.-U.; Hayes, J.M.; Sylva, S.P.; Brewer, P.G.; DeLong, E.F. (1999) Methane-consuming archaeobacteria in marine sediments. *Nature* **398**: 802-805.
- Hinrichs, K. U. & Boetius, A. B. (2002) The anaerobic oxidation of methane: new insights in microbial ecology and biogeochemistry. In *Ocean Margin Systems*. Wefer, G.; Billet, D.; Hebbeln, D.; Jørgensen, B. B.; Schlüter, M.; van Weering, T. (eds.) Heidelberg: Springer-Verlag, 457-477.
- Hoehler, T. M.; Alperin, M. J.; Albert, D. B.; Martens, C. S. (1994) Field and laboratory studies of methane oxidation in an anoxic marine sediment: Evidence for a methanogen – sulfate reducer consortium. *Global Biogeochemical Cycles* **8**: 451-463.
- Hoehler, T. M.; Alperin, M.J.; Albert, D.B.; Martens, C.S. (1998) Thermodynamic control on hydrogen concentrations in anoxic sediments. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **52**: 1745-1756.
- Ingram, J. M. & Blackwood, A. C. (1970) Microbial production of phenazines. *Advances in Applied Microbiology* **13**: 267-282.
- Iversen, N. & Blackburn, T.H. (1981) Seasonal rates of methane oxidation in anoxic marine sediments. *Applied and Environmental Microbiology* **41**: 1295-1300.
- Iversen, N (1996) Methane oxidation in coastal marine environments. In *Microbiology of atmospheric trace gases*. Murrel, J. C. and Kelly, D. P. (eds.) Heidelberg: Springer-Verlag, 51-68.
- Jäckel, U. (1997) Die Bedeutung der mikrobiellen Eisenreduktion im Reisfeldboden. Diploma Thesis, University of Marburg.

- Jørgensen, B.B. & Bak, F. (1991) Pathways and microbiology of thiosulfate transformations and sulfate reduction in a marine sediment (Kattegat, Denmark). *Applied and Environmental Microbiology* **57**: 847-856.
- Joye, S. B.; Boetius, A.; Orcutt, B. N.; Montoya, J. P.; Schulz, H. N.; Erickson, M. J.; Lugo, S. K. (2003) The anaerobic oxidation of methane and sulfate reduction in sediments from Gulf of Mexico cold seeps. *Chemical Geology* (accepted).
- Klenk, H.-P.; Clayton, R. A.; Tomb, J.-F.; White, O.; Nelson, K. E., *et al.* (1997) The complete genome sequence of the hyperthermophilic, sulphate reducing Archaeon *Archaeoglobus fulgidus*. *Nature* **390**: 364-370.
- Knittel, K.; Boetius, A.; Lemke, A.; Eilers, H.; Lochte, K. *et al.* (2003) Activity, distribution, and diversity of sulfate reducers and other bacteria in sediments above gas hydrate (Cascadia Margin, OR). *Geomicrobiology Journal* **20**: 369-294.
- Krüger, M.; Meyerdierks, A.; Glöckner, F. O.; Amann, R.; Widdel, F. *et al.* (2003) A conspicuous nickel protein in microbial mats that oxidize methane anaerobically. *Nature* (accepted).
- Kvenvolden, K. A. (1993) Gas hydrates – geological perspectives and global change. *Geophysical Reviews* **31**: 173-187
- Linke, P. & Suess, E. (2000) RV Sonne cruise report SO148. *TECFLUX-II-GEOMAR Report* **98**:122.
- Luff, R. Und Wallmann, K. (2003) Fluid flow, methane flux, carbonate precipitation and biogeochemical turnover in gas hydrate-bearing sediments at Hydrate Ridge, Cascadia margin: Numerical modeling and mass balances. *Geochim. Cosmochim. Acta* **67**: 3403-3421.
- Michaelis, W.; Seifert, R.; Nauhaus, K.; Treude, T.; Thiel, V. *et al.* (2002) Microbial reefs in the Black Sea fueled by anaerobic oxidation of methane. *Science* **297**: 1013-1015.
- Moore, L.G.; Rocap, G.; Chisholm, S.W. (1998) Physiology and molecular phylogeny of coexisting *Prochlorococcus* ecotypes. *Nature* **393**: 464-467.
- Nauhaus, K.; Boetius, A.; Krüger, M.; Widdel, F. (2002) *In vitro* demonstration of anaerobic oxidation of methane coupled to sulphate reduction in sediments from a marine gas hydrate area. *Environmental Microbiology* **4**: 296-305.



- Nisbet, E.G. & Sleep, N.H. (2001) The habitat and nature of early life. *Nature* **409**:1083-1091.
- Oremland, R. S. & Capone, D. G. (1988) Use of "specific" inhibitors in biogeochemistry and microbial ecology. *Advances in Microbial Ecology* **10**: 285-383.
- Orphan, V. J.; House, C. H.; Hinrichs, K.-U.; McKeegan, K. D.; DeLong, E. F. (2002) Multiple archaeal groups mediate methane oxidation in anoxic cold seep sediments. *Proceedings of the National Academy of Science* **99**: 7663-7668.
- Overmann, J.; Tuschak, C.; Fröstl, J.; Sass, H. (1998) The ecological niche of the consortium "*Pelochromatium roseum*". *Archives of Microbiology* **169**: 120-128.
- Overmann, J. & van der Gemerden, H. (2000) Microbial interactions involving sulfur bacteria: implications for the ecology and evolution of bacterial communities. *FEMS Microbiology Reviews* **24**: 591-599.
- Paull, C. P.; Ussler, W.; Dillon, W. (1991) Is the extend of glaciation limited by methane gas-hydrates? *Geophysical Research Letters* **18**: 432-434.
- Rabus, R.; Fukui, M.; Wilkes, H.; Widdel, F. (1996) Degradative capacities and 16S rRNA-targeted whole-cell hybridization of sulfate-reducing bacteria in an anaerobic enrichment culture utilizing alkylbenzenes from crude oil. *Applied and Environmental Microbiology* **62**: 3605-3613.
- Reeburgh, W. S. (1996) "Soft spots" in the global methane budget. In *Microbial growth on Cl compounds*. Lidstrom, M. E. & Tabita, F. R. (eds.) Kluwer Academic Publishers: 334-342.
- Rowan, R. & Knowlton, N. (1995) Intraspecific diversity and ecological zonation in coral-algal symbiosis. *Proceedings of the National Academy of Science USA*. **92**: 2850-2853.
- Schink, B. & Stams, A. J. M. (2001) Syntrophism among prokaryotes. In *The Prokaryotes, an Evolving Electronic Resource for the Microbiological Community*. Dworkin, M.; Falkow, S.; Rosenberg, E.; Schleifer, K.-H.; Stackebrandt, E. (eds). Heidelberg: Springer Science Online. ([www.prokaryotes.com](http://www.prokaryotes.com)).
- Schwertmann, U. & Cornell, R.M. (1991) Iron oxides in the laboratory, preparation and characterisation. VCH, Weinheim.

- Seeliger, S. R.; Cord-Ruwisch, R.; Schink, B. (1998) A periplasmic and extracellular c-type cytochrome of *Geobacter sulfurreducens* acts as ferric iron reductase and as electron carrier to other acceptors or to partner bacteria. *Journal of Bacteriology* **180**: 3686-3691.
- Shyu, J. B. H.; Lies, D. P.; Newman, D. K. (2002) Protective role of *tolC* in efflux of the electron shuttle anthraquinone-2,6-disulfonate. *Journal of Bacteriology* **184**: 1806-1810.
- Sørensen, K. B.; Finster, K.; Ramsing, N. B. (2001) Thermodynamic and kinetic requirements in anaerobic methane oxidizing consortia exclude hydrogen, acetate and methanol as possible shuttles. *Microbial Ecology* **42**: 1-10.
- Spormann, A. & Widdel, F. (2000) Metabolism of alkylbenzenes, alkanes, and other hydrocarbons in anaerobic bacteria. *Biodegradation* **11**: 85-105.
- Straub, K. L. & Schink, B. (2003) Evaluation of electron-shuttling compounds in microbial ferric iron reduction. *FEMS Microbiology Letters* **220**: 229-233.
- Teske, A.; Hinrichs, K.-U.; Edgcomb, V.; Gomez, A.D.V.; Kysela, D. *et al.* (2002) Microbial diversity of hydrothermal sediments in the Guyamas Basin: Evidence for anaerobic methanotrophic communities. *Applied and Environmental Microbiology* **68**: 1994-2007.
- Treude, T.; Boetius, A.; Knittel, K.; Wallmann, K.; Jørgensen, B. B. (2003) Anaerobic oxidation of methane above gas hydrates (Hydrate Ridge, OR). Submitted to *Marine Ecology Progress Series*.
- Valentine, D.L. & Reeburgh, W.S. (2000) New perspectives on anaerobic methane oxidation. *Environmental Microbiology* **2**: 477-484.
- Valentine, D. L. (2002) Biogeochemistry and microbial ecology of methane oxidation in anoxic environments: a review. *Antonie van Leeuwenhoek* **81**: 271-282.
- Widdel, F. & Bak, F. (1992) Gram negativ mesophilic sulfate-reducing bacteria. In *The Prokaryotes*. Balows, A., Trüper, H. G., Dworkin, M., Harder, W., and Schleifer, K.-H. (eds). New York: Springer, 3352-3378.
- Yamamoto, S.; Alcauskas, J. B.; Crozier, T. E. Solubility of methane in distilled water and seawater. *Journal of Chemical and Engineering Data* **21**: 78-80.

Zehnder, A. & Brock, T. (1980) Anaerobic methane oxidation: occurrence and ecology.  
*Applied and Environmental Microbiology* **38**: 194-204.

***In vitro* growth of anaerobic consortia of archaea and sulfate-reducing-bacteria with methane as the sole electron donor**

Katja Nauhaus<sup>1</sup>, Melanie Albrecht<sup>1</sup>, Marcus Elvert<sup>2</sup>, Antje Boetius<sup>1,3\*</sup>

Manuscript in preparation

---

<sup>1</sup> Max Planck Institute for Marine Microbiology, Celsiusstrasse 1, D-28359 Bremen, Germany

<sup>2</sup> Research Center Ocean Margins, University of Bremen, Am Fallturm 1, D-28359 Bremen, Germany

<sup>3</sup> International University of Bremen, Campusring 1, D-28759 Bremen, Germany

\*For correspondence: E-mail: [aboetius@mpi-bremen.de](mailto:aboetius@mpi-bremen.de); Tel.: (+49) 421 2028 648; Fax (+49) 421 2028 790

## Abstract

Growth and enrichment of anaerobically methane oxidizing consortia composed of archaea (ANME-2) and sulfate-reducing-bacteria (*Desulfosarcina/Desulfococcus* cluster) was observed and quantified in a long-term laboratory experiment lasting over two years. As inoculum we used samples from marine methane-hydrate bearing sediments (Hydrate Ridge, NE Pacific). These had a high activity in anaerobic oxidation of methane (AOM) and a high biomass of presumably methane oxidizing consortia. The same sediment sample was incubated repeatedly under elevated methane partial pressure of 1.37 MPa. In 60 subsequent incubation periods methane-dependent sulfate reduction rates increased continuously from 0.0035 to 0.23 mmol d<sup>-1</sup> g<sub>dw</sub><sup>-1</sup> of sediment. Higher activity was accompanied by a gain in biomass observed as a tenfold increase in numbers of consortia and up to 150times higher concentrations of biomarkers specifically assigned to organisms performing AOM. Fluorescence *in situ* hybridization with specific oligonucleotide probes revealed that the consortia grown in the enrichment are very similar to those present *in situ*. Microscopic examination suggests three modes of growth for the enriched consortia. 1) Archaea and SRB grow together from the early stage of a few cells, developing from the association of a few cells to big spherical aggregates of several micrometers in diameter. 2) Large aggregates tend to divide evenly into two aggregates or small aggregates separate from big ones when SRB grow into the gaps between archaeal colonies within an aggregate. 3) Very large aggregates burst and release numerous single SRB and archaeal cells, which probably form new small consortia. From our observations and from the visualization of a theoretical model we presume that the major mode of growth under natural conditions is the division of large consortia into smaller ones.

**Key words:** AOM, archaea, sulfate reduction, growth, consortia, methanotrophs, biomarker

## Introduction

Biogeochemical investigations have shown that the microbially mediated anaerobic oxidation of methane (AOM) is the major sink for methane in the ocean and hence a significant process in the carbon cycle and the global methane budget (Reeburgh, 1996; Hinrichs & Boetius, 2002). Molecular studies combining the analysis of 16S rRNA gene sequences with the stable isotope signatures of specific biomarkers identified the presumptive responsible microorganisms which form a consortium of archaea affiliated with the Methanosarcinales and sulfate-reducing-bacteria (SRB) of the *Desulfosarcina/Desulfococcus* group (Hinrichs et al., 1999; Boetius *et al.*, 2000; Pancost et al., 2000; Michaelis et al., 2002; Orphan *et al.*, 2001, 2002; Elvert et al., 2003). Recently, the first *in vitro* laboratory studies were conducted investigating physiological properties of the anaerobic methanotrophs (ANME) in sediment slurries with high rates of sulfate-reducing activity dependent on methane as the electron donor (Nauhaus *et al.*, 2002). Girguis *et al.* (2003) were able to enrich ANME groups in intact sediment cores mounted to a continuous-flow incubation system. In their study cores from inactive sites showed an increase in AOM rates and in 16S rRNA clones of the ANME-1 and ANME-2 group as well as in the abundance of genes for one subunit of the methyl-coenzyme M reductase (*mcrA*), which catalyzes the last step in methanogenesis. The experiments discussed in this communication are the first quantitative analysis of consortia growing *in vitro* with elevated methane partial pressure.

The main reason why it has been so difficult to obtain enrichments of the ANME is the very slow growth, due to the low free energy gain by sulfate dependent AOM in contrast to the aerobic oxidation with oxygen. Under laboratory conditions with atmospheric methane pressure the free energy yield of AOM is only about  $-23.6$  kJ per mol of methane oxidized. Considering that this energy has to be shared between the two partners of the consortium, it becomes evident that the minimum energy quantum required for energy conservation of  $-15$  to  $-20$  kJ per mol reaction is not reached (Schink, 1997). One reason for the low energy yield of the reaction under atmospheric pressure is the low solubility of methane in water, which is even less in seawater (0.033 l/l or 1.42 mM, values for 12 °C; calculated after Yamamoto *et al.*, 1976). The solubility of methane increases linearly with higher pressures and hence with increasing water depth. For example, the *in*

*situ* conditions for AOM in methane saturated sediments and approx. 28 mM sulfate at southern Hydrate Ridge, NE Pacific at 780 m water depth allow a free energy gain of up to  $-40$  kJ/mol. Here the minimum free energy requirement for growth could be provided for both partners in a methanotrophic consortium.

It has been speculated that the shape and size of the cells in an AOM consortium also affect the free energy gain of the AOM reaction (Boone et al., 1989; Harder, 1997; Sørensen *et al.*, 2001). Small spherical cells provide the best surface to volume ratio for syntrophic transfer and close cell to cell contact would improve energy transfer. The described ANME-2/DSS consortium from Hydrate Ridge presumably mediating AOM meets these prerequisites very well. The two partners are arranged in a sphere with the archaea as an inner core surrounded by a shell of SRB which are somewhat smaller than the archaea (Boetius *et al.*, 2000). Theoretically the energetic situation becomes less favorable for those cells which are not in direct contact with their syntrophic partner. Therefore it is still an open question if all organisms on a consortium are active and if there is a size limit for the consortia.

However, due to slow growth and the low energy yield and therefore probably also low growth yields the enrichment of AOM consortia has so far not been possible. In the course of 2 years, we were able to investigate the increase of AOM activity in correlation with abundance and size of methane oxidizing consortia. To increase the amount of free energy available from the reaction the samples were incubated in high pressure devices with a methane partial pressure of 1.37 MPa resulting in a theoretical free energy gain of  $-35$  kJ/mol. Epifluorescence microscopy and molecular studies with fluorescently labeled oligonucleotide probes (FISH) specific for 16S rRNA partial gene sequences as well as biomarker analyses were performed to quantify the growth rates of the anaerobic methanotrophs. The morphological development of the aggregates was simulated in 3D, based on the measured growth rates.

## Methodology

### *Origin and storage of samples*

Sediment samples were taken during RV SONNE cruise SO-148/1 in August 2000 at the crest of the southern Hydrate Ridge (HR), NE Pacific (44°34' N, 125°09' W; 780 m water depth) in areas of active gas seeping using a video-guided multiple corer (Linke *et al.*, 2000). For this experiment sediments covered by the filamentous sulfide oxidizing bacterium *Beggiatoa* (1–4 cm sediment depth), and by the clam *Calyptogena* (0–2 cm sediment depth) were combined and used as inoculum (2/3 of 1–4 cm and 1/3 of 0–2 cm). The sediment samples were stored under anoxic conditions in glass bottles at 5 °C until further processing in the laboratory.

### *Anoxic incubations*

Experiments were carried out in glass tubes (20 ml) sealed with butyl-rubber stoppers and screw caps. 3 ml of sediment slurry were incubated with 8 ml of artificial seawater medium (Widdel & Bak, 1992) as described by Nauhaus *et al.* (2002). All manipulations were performed under an atmosphere of N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (90/10 [v/v]) in an anoxic glove chamber (Mecaplex). The headspace of the incubation tubes contained either methane (100%) or nitrogen/carbon dioxide (90/10 [v/v]) in control experiments. Incubations at atmospheric pressure (0.1 MPa) were incubated horizontally at 12 °C and gently shaken once per day. For incubations at 1.37 MPa methane partial pressure the tubes were incubated in special pressure incubation steel cylinders (Nauhaus *et al.*, 2002). Prior to the pressure incubation the tubes were connected to a 10 ml syringe filled with anoxic medium to transmit the external pressure via a hypodermic needle to the inside of the tube while methane is dissolving (for further details see Nauhaus *et al.*, 2002). After depressurization and equilibration of the methane pressure for 24 hours at atmospheric pressure, the sulfide concentration was determined.



### *Experimental design of enrichment incubations*

Transfers of only 10% of active samples are common in microbiology to enrich and isolate organisms. However, in AOM incubations of active sediments from Hydrate Ridge this method led to a long term loss of activity. In contrast, subsequent incubations of the same sediment aliquot at atmospheric methane pressure showed increasing sulfate reduction rates over time. Therefore, the overlying medium was removed after sedimentation of the sediment and replaced by fresh medium to remove the sulfide produced, and to provide sulfate and methane. In two independent incubations over 770 and 830 days, the methane dependent sulfate reduction in A and B increased from 8.7 to 70.46 and from 19.5 to 96.43  $\mu\text{mol d}^{-1}\text{g}_{\text{dw}}^{-1}$ , respectively. The highest increase in methane dependent sulfate reduction activity was observed in subsequent incubations with elevated methane partial pressure (1.37 MPa) and exchange of media and methane in between incubation periods. Two independent replicates (A and B) were analyzed over the entire duration of the experiment. For simplicity we only discuss one replicate (A); B gave the same results. Incubation periods lasted about 30 days in the first year of the experiment. The time between exchanges of media decreased due to faster increase in sulfide concentration from 30 days down to 5–9 days in the second year. The sulfide concentrations reached 10 to 14 mM during one incubation period before 28 mM sulfate and 19 mM methane were re-supplied.

### *Analyses*

Samples of medium and sediment slurry for chemical analyses, cell counts, and biomarker analyses were withdrawn with hypodermic needles and plastic syringes pre-flushed with  $\text{N}_2$  through the butyl-rubber stoppers. The headspace of the tubes were flushed with methane and gently shaken. After sedimentation the sulfide concentration was determined and the tubes were either incubated horizontally and shaken once per day or provided with syringes and incubated under pressure as described above.

Dry weight was determined after drying at 70 °C for 48 h.

Sulfate reduction rates were calculated per gram dry weight ( $\text{g}_{\text{dw}}$ ) of sediment.

Sulfide was determined using the colorimetric assay with the formation of copper sulfide (Cord-Ruwisch, 1985).

#### *Epifluorescence counts of the consortia*

Every fifth incubation period (Figure 1) a defined sample was withdrawn from the two replicate pressure incubations (A and B). These sub-samples were fixed in formalin (3% final concentration) and stored at 4 °C until further processing. Dilutions of these samples were filtered on polycarbonate filters (GTBP, 0.2 µm pore size; Millipore, Eschborn, Germany), stained with Acridine-Orange (Meyer-Reil, 1983) and counted with the filter set No. 09 with an Axioplan microscope (Zeiss, Oberkochen, Germany). Two replicate filters were used to quantify consortia numbers and size classes in the incubations. Staining of replicate probes with Acridine-Orange and FISH in parallel revealed that the same consortia identified with FISH can be recognized visually in samples stained solely with Acridine-Orange, and that there are hardly any other consortia present (Knittel *et al.*, 2003). For each sample approx. 1000 consortia were counted by systematically screening the filters. Earlier analyses of Hydrate Ridge sediments have shown that most consortia are smaller than 3 µm in diameter. However, early on in the experiment we observed the development of larger aggregates and decided to follow their development. The consortia were differentiated into different size classes according to their diameter (<6 µm, 6 µm, 12 µm, 18 µm, and ≥25 µm). Doubling times were calculated by dividing the increase in number of the consortia by the incubation time.

#### *Fluorescence in situ hybridization (FISH)*

For fluorescence *in situ* hybridization (FISH) samples were fixed for two hours at 4 °C in formalin (3% final concentration), washed twice in 1×PBS (10 mM sodium phosphate; 130 mM NaCl) and finally stored in 1×PBS/Ethanol (1:1) at -20 °C. Dilutions of the samples were filtered on polycarbonate filters (GTTP, 0.2 µm pore size; Millipore, Eschborn, Germany) and coated with agarose (Pernthaler *et al.*, 2002). Hybridization of the cells and staining with 4',6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI) was performed as described in Snaidr *et al.* (1997). The probes and the respective formamide (FA) concentrations used

were the following: *Desulfosarcina/Desulfococcus* group, DSS658 (50% FA; Boetius *et al.*, 2000), ANME-2 cells, ANME647/ANME622 (50% FA, K. Knittel, pers. communication); archaeal cells, ARCH915 (35% FA; Amann *et al.*, 1995) and eubacterial cells, EUB338 I-III (35% FA; Daims *et al.*, 1999). All probes were labeled with cy3; except for DSS658 which was also used with cy5 (ThermoHybaid, Ulm, Germany). For each sample either cells on 500 fields of a filter or 1000 cells on one filter were counted.

#### *Biomarker analyses of the enrichment and an in situ sample*

Lipids were extracted from enrichments and the *in situ* sample were extracted, fractionated into different lipid classes and analyzed by gas chromatography (GC), coupled gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) as well as coupled gas chromatography-isotope ratio mass spectrometry (GC-IRMS) according to methods reported previously by Elvert *et al.* (2003) and Niemann *et al.* (submitted). Briefly, samples were extracted by ultrasonification with different mixtures of methanol/dichloromethane yielding a total lipid extract (TLE). The TLE was then separated into whole cell fatty acids and neutral lipids. Neutral lipids were further separated into hydrocarbons, ketones and alcohols by column chromatography using silica SPE glass cartridges. For GC, GC-MS and GC-IRMS investigations, fatty acids and alcohols were analyzed as fatty acid methyl esters (FAMES) or trimethylsilyl ethers (TMS-derivatives), respectively. Hydrocarbons were analyzed without derivatization. Double bond positions in FAMES and TMS-derivatives of alcohols were verified by the preparation of dimethyl disulfide (DMDS) adducts; specific ring positions in FAMES were determined by the preparation 4,4-dimethyloxazoline (DMOX) derivatives. All concentrations reported were calculated relative to internal standards added prior to extraction.

#### *Isolation of sulphate-reducing-bacteria (SRB) and methanogenic archaea*

Enrichments and direct dilution series were performed under strictly anoxic conditions in 20 ml glass tubes, with butyl-rubber stoppers and screw caps, containing 14 ml of artificial mineral seawater medium (Widdel & Bak, 1992; see also for technical details) buffered with bicarbonate-CO<sub>2</sub> (pH 7.5) under a headspace of N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (90/10 [vol/vol]) pre-reduced

with 0.5 mM sulfide. For the isolation of methanogens media without sulfate were used. Samples were incubated at 12 °C in the dark. The initial inoculum was 0.033 g<sub>dw</sub> of sediment of the 1 – 4 cm horizon. As substrates acetate (10 mM), formate (10 mM), methanol (10 mM), lactate (10 mM), mono- and trimethylamine (5 mM, 2 mM), fatty acid mixture (propionate 3 mM, butyrate 2 mM, capronate 1 mM), isopropanol (15 mM) and H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (80:20 [vol/vol]), with and without 0.5 mM acetate were added. All substrates were taken from anoxic sterile stock solutions and the gas was filtered through 0.2 µm filters. For methanogens one additional approach with H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> and antibiotics (ampicillin and kanamycin 0.03 g/l each) was set up. Growth was detected by measuring sulphide and methane production, and subsequent microscopic examination of positive tubes. Pure cultures of methanogens and SRB were obtained after two or three liquid (methanogens) or agar (SRB) dilution series of the highest positive original dilutions, respectively.

Methane was determined using a GC 14B gas chromatograph (Shimadzu) equipped with a Supel-Q Plot column (30 m × 0.53 mm; Supelco) and a flame ionization detector. The carrier gas was N<sub>2</sub> at a flow rate of 3 ml min<sup>-1</sup>. The column temperature was 110 °C.

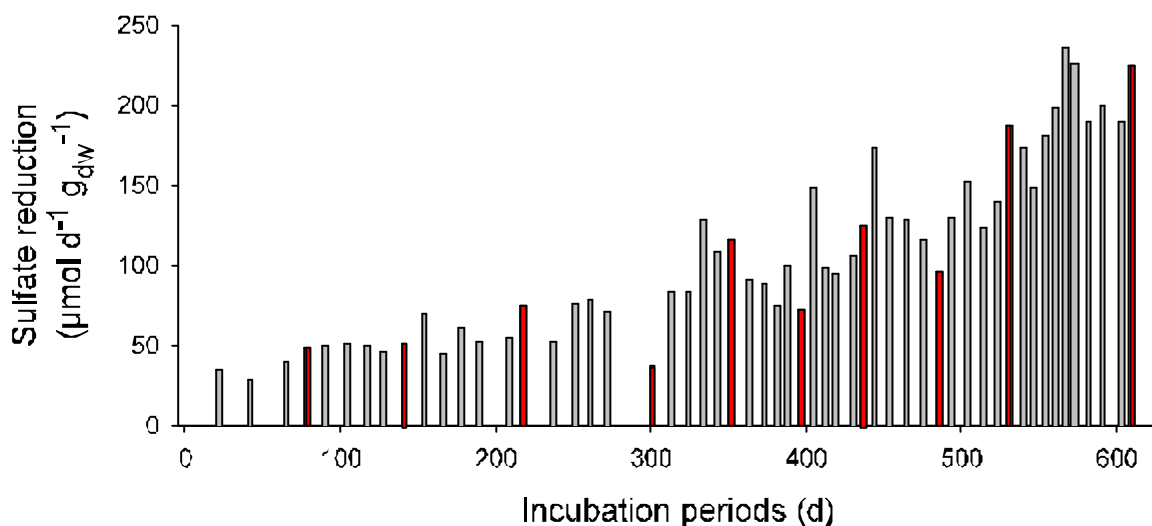
#### *Phylogenetic analyses of Isolates*

DNA was extracted from approx. 10 ml of freshly grown cultures with the DNeasy tissue kit (Quiagen, Hilden, Germany). The purified PCR product of the 16S rRNA gene was sequenced with the 3100 Genetic Analyzer Abi Prism (Applied Biosystems, Hitachi) using dyelabeled dideoxynucleotides. Sequence data were analysed with the Sequencher program from Gene Codes Cooperation (Michigan, USA). Phylogenetic affiliations were checked with the NCBI database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) and the ARB software package (Strunk *et al.*, 2002).

## Results

### *Methane dependent sulfate reduction rates in high pressure incubations*

The highest methane dependent sulfate reduction rate ( $11 \mu\text{mol d}^{-1} \text{g}_{\text{dw}}^{-1}$  of sediment) so far measured in a natural habitat was found at Hydrate Ridge (Cascadia Margin, off Oregon, USA; Boetius & Suess, 2003; Hinrichs & Boetius, 2002). These sediments are well suited for laboratory experiments because the high AOM activity could be maintained in the laboratory for several years. For the experiments described here we used sediment slurry from active sediments with an average methane dependent sulfate reduction of  $2.5 \mu\text{mol d}^{-1} \text{g}_{\text{dw}}^{-1}$  at atmospheric pressure (Nauhaus *et al.* 2002). First incubations of this sediment under elevated methane partial pressure (1.1 MPa) yielded a higher rate ( $5 \mu\text{mol d}^{-1} \text{g}_{\text{dw}}^{-1}$ ; Nauhaus *et al.*, 2002). During the course of the experiment over 606 days, methane dependent sulfate increased continuously; generally following a linear trend (Fig. 1). At the beginning of the enrichment experiment, SR was already as high as  $0.035 \text{ mmol d}^{-1} \text{g}_{\text{dw}}^{-1}$  because the samples had already been pre-incubated under pressure with continuous re-supply of sulfate and methane for almost one year. Sulfate reduction increased from  $0.0035 \text{ mmol d}^{-1} \text{g}_{\text{dw}}^{-1}$  at day one to  $0.23 \text{ mmol d}^{-1} \text{g}_{\text{dw}}^{-1}$  at day 606 of the

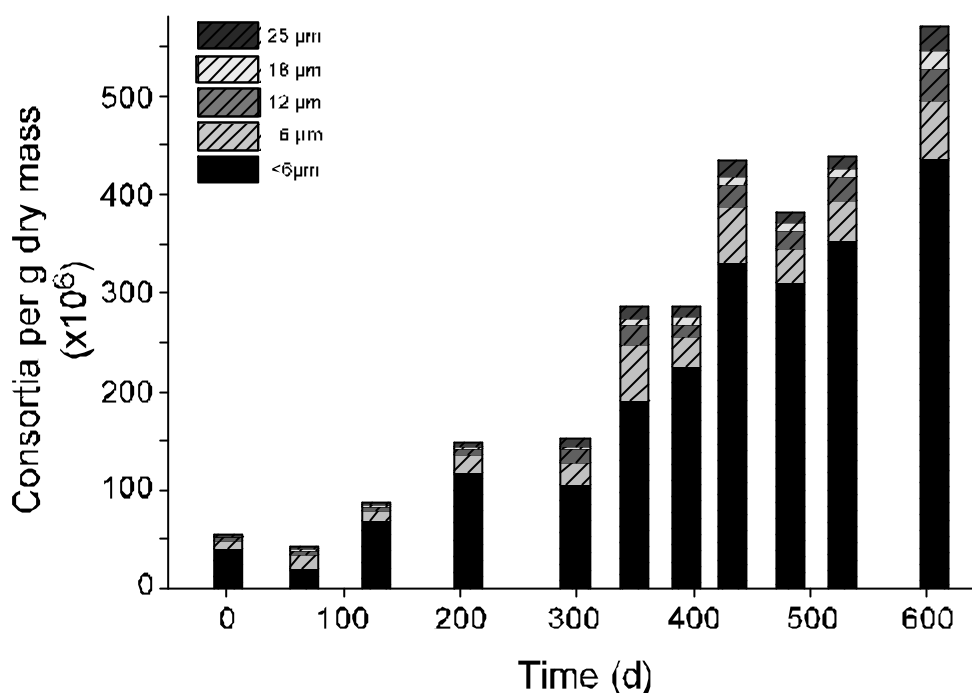


**Fig. 1** Sulfate reduction with methane as the only electron acceptor in the same sediment sample incubated with elevated methane partial pressure (1.37 MPa). Marked in red are incubation periods when samples for consortia counts were withdrawn.

long-term experiment. Until a sulfate reduction of  $0.23 \text{ mmol d}^{-1} \text{ g}_{\text{dw}}^{-1}$  was reached the samples went through more than 60 incubation periods each lasting between 30 and 5 days depending on the sulfide production in the individual incubations. Throughout the long-term experiment every tenth incubation period 50% of the sediment was transferred to a new tube to further increase the consortia by this moderate dilution. These transfers were also provided with fresh medium and methane and incubated under high pressure for ten further incubation periods until the next 50% transfer was done. In the ninth and so far last transfer the methane dependent sulfate reduction reached  $9.5 \text{ mmol d}^{-1} \text{ g}_{\text{dw}}^{-1}$ .

#### *Growth of methanotrophic consortia in high pressure incubations*

To answer the question if increasing methane dependent sulfate reduction was resulting from an increase in the biomass of the anaerobic methane oxidizers or just from an increase of the specific activity of the present community, counts of the consortia growing in the high pressure incubations were conducted. During the observation time of 606 days (60 incubation periods) 10 samples were counted. The replicate incubations A and B gave similar results, therefore we only discuss values of incubation A shown in Fig. 1 and 2. The total number of consortia increased continuously over 20 months (Fig. 2). In the last sample (606 days) their number had increased more than tenfold from  $5.5 \times 10^7$  in the beginning of the enrichment experiment to  $5.7 \times 10^8$  consortia  $\text{g}_{\text{dw}}^{-1}$ . The smallest aggregates ( $<6 \mu\text{m}$  in diameter) made up the largest fraction of all consortia, almost 10 times as many as of the other size classes as already described in Boetius *et al.* 2000. In all size classes numbers of consortia increased continuously over time (Fig 2). The overall increase within a size class was largest for the biggest consortia if  $\geq 25 \mu\text{m}$  in diameter. The average doubling time for a consortium was calculated to be 4.7 month.



**Fig. 2** Number of consortia ( $\times 10^6$ ) in the course of the subsequent incubations with elevated methane partial pressure. The stacked columns show the relative abundance of the different size classes of the consortia; the smallest size class is at the bottom of the column, the biggest at the top.

Calculated doubling times of the different size classes revealed the shortest doubling time for the biggest consortia (2.3 months) and increasing doubling times for consortia with decreasing size (2.7 to 5.7 months for 18 to 6  $\mu\text{m}$  diameters). The smallest consortia had a shorter doubling time of 3.8 month.

Microscopic examinations showed that the consortia are embedded in a thick organic matrix and are always associated with sediment particles or flocs of precipitated FeS. However it is possible that the removal of the overlying medium after sedimentation of the sample in between incubation periods may have caused a loss of consortia. Therefore the presented data on growth of the consortia are most likely underestimates

Epifluorescence microscopy revealed big consortia that seem to be evenly divided by SRB cells growing into the centre of the sarcina-like packaged colonies of archaea (Fig. 3A). Also unequal division by small consortia separating from big ones was observed (Fig. 3B). Only at the later sampling dates we noticed the increasing occurrence of large

consortia (>18  $\mu\text{m}$ ) which opened and expelled enormous amounts of single cells. FISH analyses revealed that these cells were of archaea as well as of SRB

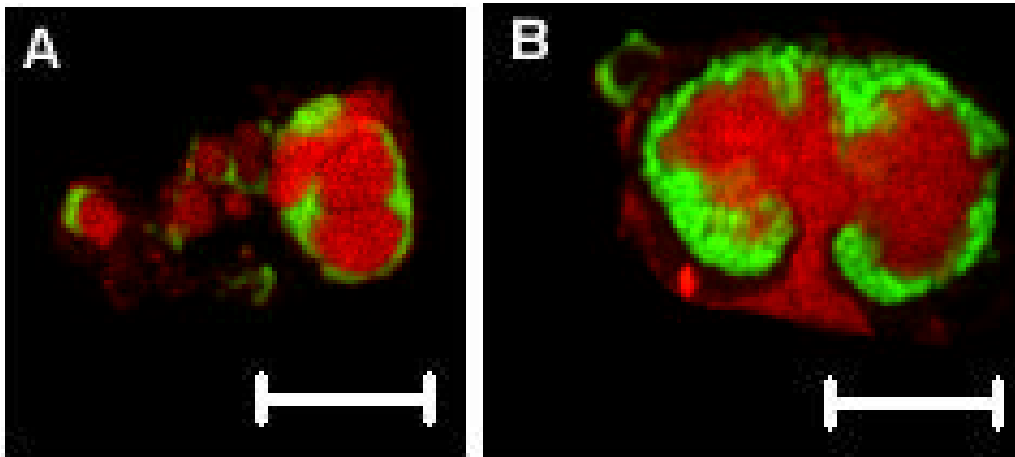


Fig. 3 Consortia from the enrichment hybridized with fluorescently labeled oligonucleotide probes specific for ANME-2 (ANME647/622, red) and SRB of the *Desulfosarcina/Desulfococcus* group (DSS658, green). (A) Small consortia are separating from a big one. (B) SRBs grow from the outside shell into the inner core of Archaea dividing the consortium evenly. The scale bar represents 10  $\mu\text{m}$ .

#### *Biomarker evidence for selective enrichment of AOM consortia*

One sample was used for biomarker analyses (1.5 years incubation under elevated methane partial pressure). In comparison with the biomarker fingerprint of the starting material an enrichment of archaeal and bacterial lipids specifically assigned to anaerobic methanotrophic organisms was observed in the pressure incubated sample (Table 1). Due to the enrichment the overall lipid spectrum was less diverse and some compounds diminished completely while others increased significantly. Archaeal lipids such as isoprenoidal hydrocarbons (crocetane, PMI:3, PMI:4) and glycerol diethers (archaeol and *sn*-2-hydroxyarchaeol) specific for ANME-2 (Elvert *et al.*, 1999; Boetius *et al.*, 2000; Orphan *et al.*, 2001) increased by up to 85 times (in the case of crocetane) relative to the starting material. The concentration of crocetane in the enrichment was also 47 times higher compared to an *in situ* sample containing the highest concentration of biomarkers specific for organisms performing AOM analysed at Hydrate Ridge.



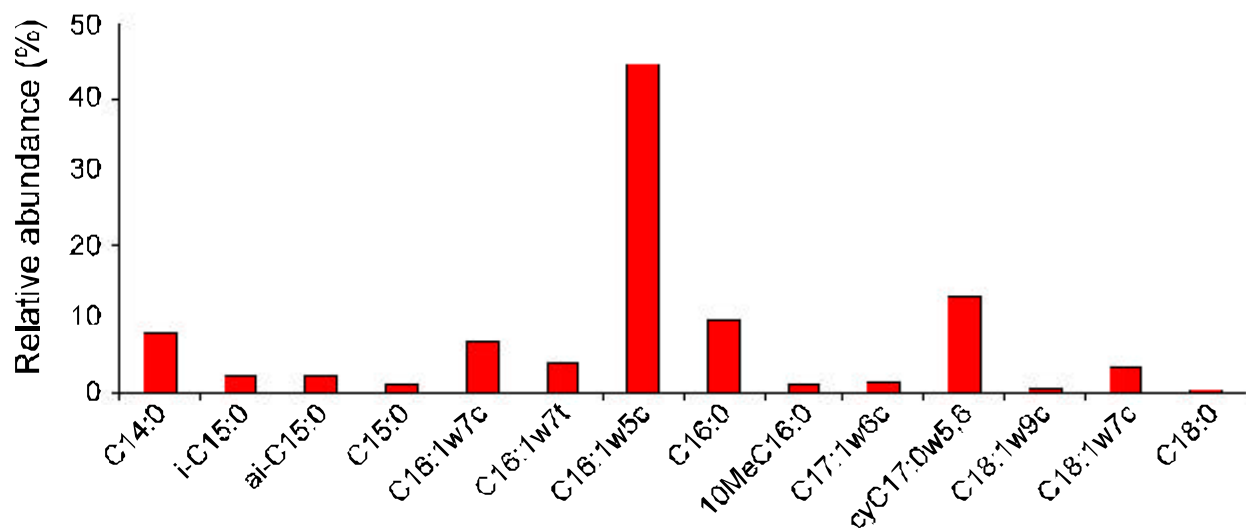
**Table 1.** Selected biomarkers of syntrophic consortia mediating AOM and various other biological sources in the enrichment and an *in situ* sample below a *Beggiatoa* mat (2-4 cm sediment depth) from Hydrate Ridge sediments.

Biological source	Compound	Enrichment start ( $\mu\text{g/g}_{\text{dw}}$ )	Enrichment after 1.5 years ( $\mu\text{g/g}_{\text{dw}}$ )	In situ sample* ( $\mu\text{g/g}_{\text{dw}}$ )	Enrichment factor (A/B)
ANME-2	Crocetane	0.7	62.1	1.3	85/47
	PMI	0.3	n.d.	0.3	0
	PMI:3	0.5	41.0	0.9	84/47
	PMI:4	0.6	41.7	1.0	73/41
	Archaeol	2.4	59.5	4.5	25/13
	<i>sn</i> -2-hydroxyarchaeol	6.7	215.3	13.6	32/16
DSS/DSC	MAGE 14:0	0.3	30.9	0.4	124/73
	MAGE 16:1 $\omega$ 5c	0.7	48.0	1.4	71/34
	MAGE 16:0	0.5	79.0	1.0	152/80
	FA 14:0	1.2	129.5	2.4	111/54
	FA 16:1 $\omega$ 5c	9.0	703.0	17.3	78/41
	FA cy17:0 $\omega$ 5,6	1.9	209.3	4.1	109/51
Aerobic bacteria	Diploptene	0.4	n.d.	0.4	0
	Bishomohopanol	0.9	n.d.	1.0	0
Planktonic archaea	Acyclic Biphytanol	0.4	n.d.	0.6	0
	Tricyclic Biphytanol	0.6	n.d.	0.7	0
Eukaryotes	Cholesterol	4.5	2.5	3.9	0.6/0.6

MAGE: *sn*-1 mono alkyl glycerol ether; FA: fatty acid, with FA concentration obtained after isotope mass balance calculations according to Elvert et al. (2003); Enrichment factors A/B: enrichment of biomarkers relative to (A) the starting material and (B) an *in situ* sample with the highest concentration of biomarkers specific for AOM mediating organisms analyzed at Hydrate Ridge so far; n.d.: not detected.

The pentamethylcosane compounds (PMI) were detected in the starting material of the enrichment and in the *in situ* sample, but were missing in the enrichment after 20 months of incubation under elevated pressure.

Bacterial lipids such as *sn*-1-mono alkyl glycerol ethers (MAGE 14:0, 16:1?5c and 16:0) and fatty acids (FA 14:0, 16:1?5c and cy17:0?5,6) specific for SRB of the *Desulfosarcina/Desulfococcus* group were also strongly enriched (Fig. 4). But here, enrichment factors even exceeded those of the Archaea, and reached a 71 to 152fold increase relative to the beginning of the enrichment, and a 34 to 80fold increase relative to the *in situ* sample. Other biomarkers derived from various biological sources such as aerobic bacteria (diploptene, bishomohopanol), planktonic archaea (acyclic and tricyclic biphytanol) or eucaryotes in general (cholesterol) were undetectable or decreased significantly in the enrichment.



**Fig. 4** Relative abundance of membrane fatty acids specific for the partner SRB of the *Desulfosarcina/Desulfococcus* cluster in the consortia after 1.5 years of incubation.

#### *Isolation of sulfate-reducing-bacteria and methanogens*

Since the consortium consists of a methanogenic archaeon presumably operating in reverse and SRB as syntrophic partner we investigated the possibility of isolating the two groups separately. SRB and methanogens were enriched and isolated with classical substrates

(molecular hydrogen, acetate, formate, methanol, lactate and mono- and trimethylamine), leading to 14 SRB and one methanogenic strain. Sequence analyses of the partial 16S rRNA gene showed the phylogenetic affiliation in 6 different groups (Table 2). Most of the SRB strains isolated belong to the genus *Desulfofrigus*, the closest relative being *Desulfofrigus fragile* from cold sediments (Svalbard) (Knoblauch *et al.*, 1999). The methanogenic isolate is most closely related to a clone from Guaymas Basin, a hydrothermal vent site, with presumed AOM activity (Teske *et al.*, 2002).

Despite the fact that none of our isolates were affiliated with the organisms of the AOM consortium, we tested their capability to anaerobically oxidize methane as the only carbon source and electron donor. During four months of incubation we could not observe anaerobic methane oxidation in incubations of all SRBs or the methanogenic isolate. Also as a mixed culture they were not able to perform AOM.

**Table 2** Isolates of SRB (HRS) and methanogens (HRM) and their phylogenetic affiliation

Isolated Strains	Closest relative	Similarity (%)	Source of the closest relative	Reference
HRS-4, -11	Unidentified bacterium	94	Hard rock boreholes	Pedersen <i>et al.</i> (1996)
HRS-7, -9, -10	<i>Desulfobacterium vacuolatum</i>	98	Svalbard sediments	Sahm <i>et al.</i> (1999)
HRS-8, -14	Uncultured Desulfobacula clone	97	Antarctic sediments	Purdy <i>et al.</i> (2002)
HRS-1, -2, -3, -5, -6	<i>Desulfofrigus fragile</i> sp. LSv21	98	Svalbard sediments	Knoblauch <i>et al.</i> (1999)
HRM-1	Uncultured archaeon	98	Guaymas Basin	Teske <i>et al.</i> (2002)

## Discussion

The microbially mediated anaerobic oxidation of methane is of relevance for the global carbon and methane cycle (Hinrichs & Boetius, 2002 and references therein), but remains an enigmatic process as long as the responsible microorganisms have not been cultivated. Hence biochemical and physiological details of the process are still subject of speculation, such as the nature of the enzymes involved in methane oxidation, the function of the SRB in the consortia, and the intermediate(s) exchanged between the partners (Valentine & Reeburgh, 2000). Some general aspects of the process, for example the 1:1 stoichiometry of methane to sulfate turnover, and the dependence on temperature and methane partial pressure, could be demonstrated with *in vitro* laboratory experiments using natural sediment samples (Nauhaus *et al.*, 2002). Using a continuous-flow incubation system, the long term incubation of natural sediments with methane resulted in increases in methane oxidation activity, clone numbers of ANME-1 and -2 and 16S rRNA copy numbers of anaerobic methanotrophs in formerly inactive sediment cores (Girguis *et al.*, 2003). In the experiments reported here we combined the advantages of a batch culture experiment for the study of slow growing microorganisms with a regular exchange of the growth medium as in continuous flow incubations, to achieve a substantial enrichment of AOM consortia.

Growth of organisms mediating AOM is assumed to be very slow because of the low energy yield of the process. Increasing methane partial pressure improves the energy yield due to the then higher amount of dissolved methane. Higher methane partial pressure increased methane dependent sulfate reduction rates considerably, most likely due to the increased substrate availability (Nauhaus *et al.* 2002). In this study we followed the methane dependent sulfate reduction rates in subsequent incubations of the same sediment sample from Hydrate Ridge. The methane partial pressure applied was more than 10 times higher than at atmospheric pressure, leading to 19 mM (1.37 MPa) instead of 1.3 mM (0.1 MPa) dissolved methane. In the pressurized incubations an enormous increase in methane dependent sulfate reduction was observed after 20 months, exceeding the highest rates ever measured in natural samples 20fold ( $11 \mu\text{mol d}^{-1} \text{g}_{\text{dw}}^{-1}$ ; Hinrichs & Boetius, 2002), and the highest laboratory rates 45fold ( $5 \mu\text{mol d}^{-1} \text{g}_{\text{dw}}^{-1}$ , Nauhaus *et al.*, 2002). The conditions in our high pressure incubations (12 °C, 33‰ salinity, 28 mM sulfate, 2 mM sulfide, 30 mM bicarbonate, and 19.24 mM dissolved methane) result in a theoretical free

energy yield of  $-35$  kJ per mol of methane oxidized. This is not much lower than at the calculated *in situ* conditions, leading to  $-40$  kJ ( $4^{\circ}\text{C}$ , 33‰ salinity, 20 mM sulfate, 2 mM sulfide, 10 mM bicarbonate, and methane saturation at 780 m water depth). However, our incubation tubes are closed systems where an increase in sulfide and bicarbonate as well as the decrease in sulfate and methane concentration during each incubation period might decrease the energy gain. Still the much higher sulfate reduction rates in our incubations compared to *in situ* values can only be explained by a substantial increase in active biomass. Acridine-Orange counts of consortia and biomarker analyses constrained this assumption. Over the time of incubation (606 days) the 6.5 fold increase in methane dependent sulfate reduction rate (Fig. 1) was accompanied by a 10.5 fold increase in total numbers of consortia, resulting in  $5.7 \times 10^8$  consortia per  $\text{g}_{\text{dw}}$  (Fig. 2). Because of the low energy yield of the reaction even at elevated methane partial pressure the growth of the consortia remains slow with an average doubling time of 4.7 months.

Molecular biological analysis via FISH with specific probes and biomarker analysis showed that the enriched consortia-forming archaea and SRB are very similar to those found *in situ* at Hydrate Ridge and elsewhere, namely consortia consisting of ANME-2 archaea and SRB of the *Desulfosarcina/Desulfococcus* group (Boetius *et al.*, 2000; Orphan *et al.*, 2002). Because the AOM activity in the sediment slurry increased together with the specific enrichment of consortia biomass, this experiment confirms the phylogenetic and biomarker signatures used to identify AOM organisms in natural habitats (Hinrichs & Boetius, 2002 and references therein). AOM-specific archaeal lipids such as isoprenoidal hydrocarbons (crocetane, PMI:3, PMI:4) and glycerol diethers (archaeol and *sn*-2-hydroxyarchaeol) (Elvert *et al.*, 1999; Boetius *et al.*, 2000; Orphan *et al.*, 2001) increased up to 85 times (in the case of crocetane) relative to the concentrations at beginning of the experiment. Specific lipids of the AOM-partner SRB such as *sn*-1-mono alkyl glycerol ethers (MAGE 14:0, 16:1 $\omega$ 5c and 16:0) and fatty acids (FA 14:0, 16:1 $\omega$ 5c and cy17:0 $\omega$ 5,6) were also strongly enriched (Hinrichs *et al.*, 2000; Orphan *et al.*, 2001; Elvert *et al.*, 2003). The fatty acid pattern obtained by the enrichment confirms the hypothetical signature of *Desulfosarcina/Desulfococcus* species involved in AOM, which was based on stable isotope mass balance calculations for *in situ* samples (Elvert *et al.* 2003). The most dominant archaeal and bacterial lipids *sn*-2-hydroxyarchaeol and FA 16:1 $\omega$ 5c increased

after 2 years of incubation to up to  $215.3 \mu\text{g g}_{\text{dw}}^{-1}$  and  $703.0 \mu\text{g g}_{\text{dw}}^{-1}$ , respectively, which is equivalent to a 32 and 78fold enrichment (Table 1). These enrichment factors are much higher than those obtained for the consortia numbers. However, the biomarker yield corresponds directly to the numbers of individual cells present in the consortia. The higher relative increase in SRB-specific biomarkers compared to archaea-specific biomarkers (Table 1) is explained by the higher amount of SRB cells compared to archaeal cells, in an average consortium the ratio between SRB cells and archaeal cells is 2: 1 (Boetius et al., 2000).

The pentamethylcosane compounds (PMI) proposed as a diagnostic biomarker for AOM in a variety of studies (e.g. Elvert *et al.*, 1999; Thiel *et al.*, 1999; Pancost *et al.*, 2000) was absent in the enrichment after 20 months of incubation. This indicates that it is most probably not a biomarker for living biomass, but rather detected *in situ* as a degradation product of gradual hydrogenation of higher unsaturated counterparts during early diagenesis.

In the field, the number of consortia and their sizes are probably regulated by predation (Levin & Michener, 2002), which did not occur in our experiments. The enrichment yielded a relatively high proportion of large methanotrophic consortia. It is curious that even the 10 times larger aggregates still represent the same morphology as their smaller counterparts, which is best described as a shell type (Fig. 3). This shape is most likely caused by a specific growth pattern of the dividing cells within a consortium. The estimated doubling times differed between size classes. The largest aggregates which made up 2.7% of the total number of consortia in the beginning of the long-term experiment and 4.5% at the end had the shortest doubling time with 2.3 months. From our observations we hypothesize that the consortia have several modes of growth. (1) Starting from a few archaea and SRB cells, consortia seem to grow and develop from smaller sized consortia into bigger aggregates. (2) Larger consortia separate evenly into two or unevenly into more aggregates when SRB grow into the archaeal colonies (Fig. 3A). (3) The largest consortia (up to 100  $\mu\text{m}$  diameters were observed) appear to burst and release single cells into the environment.

To visualize the growth of the shell type consortia, a simple growth model was established and used as protocol for a 3D animation (Cinema 4D; Maxon computer GmbH;

1989-2001 Friedrichsdorf, Germany). The protocol used for the 3D visualization of the consortia growth included several basic assumptions. Growth started with one SRB and one archaeal cell, and a fixed cell size was assigned as well as a slightly variable growth rate to simulate the non-synchronized growth observed in the enrichment experiments. Based on the microscopic observations, the SRB cell is somewhat smaller than the archaeal cell in the AOM consortia (SRB: 0.4  $\mu\text{m}$  in diameter, ANME-2: 0.5  $\mu\text{m}$  in diameter). As average generation times, we assigned 3.8 months to the Archaea and 3.3 months to the SRB, allowing a variation of  $\pm 10\%$  by coincidence. After the division of any cell within the consortium, the two daughter cells received a new position in the 3D grid, somewhat overlapping with the former position of the mother cell. The only other assumption for the simulated consortium growth was that each new daughter cell should have an as close as possible contact to the surrounding partner cells. The subsequent growth of the consortium was not corrected any further. With this growth model, 7 generations of cells was visualized, producing 250 SRB cells and 130 archaeal cells within 27 months. After the 4<sup>th</sup> generation we could observe that SRB grew inwards into gaps between the archaeal cells starting to form small aggregates. The animation can be seen at <http://www.mpi-bremen.de/xxxx>.

Two main questions are raised by our observations: how big can a consortium become and how do the partner cells meet and stick together? Because the cells are provided with substrate by diffusion, in large consortia not all cells can be supplied equally, especially not those in the centre. Hence it is possible, that some cells within the larger consortium are inactive. This question should be further investigated by numerical modeling using reaction-diffusion models linked to thermodynamical considerations.

One approach to answer the second question would be the isolation and separate investigation of the two partners in the AOM consortium as conventional SRB and methanogenic archaea. However, none of our isolates matched the SRBs of the consortia, which are the most abundant bacteria *in situ*. The isolated methanogen did also not belong to the ANME-2 group. This is a common problem in the cultivation of marine strains (Giovannoni *et al.*, 1990; Ward *et al.*, 1990; Knittel *et al.*, 2003). This might indicate that these organisms either have very special requirements concerning nutrients and/or incubation conditions or that they are really specialized to oxidize methane in syntrophy.

All ANME groups are affiliated with phylogenetic clusters which contain no sequences of known isolated species. The recent finding of a modified methanogenic cofactor (F<sub>430</sub>) and the enzyme methyl-coenzyme M reductase, as well as genes for a subunit of this enzyme (*mcrA*) in sample with AOM activity (Hallam *et al.*, 2003; Krüger *et al.*, 2003) support the idea of a methanogen operating in reverse. It remains unknown whether the methane oxidizing consortia represent a syntrophic cooperation, or if there are other reasons for their close associating.



## **Acknowledgements**

We thank the officers, crew and shipboard scientific party of RV SONNE during expedition SO-148/1 for excellent support. We thank R. Appel, K. Knittel, T. Lösekann and M. Krüger for assistance in the lab and fruitful discussions. We thank J. Bendig from the company MotioanDesign (Bremen, Germany) for the cell growth animation. This study was made possible by the programs TECFLUX II (Tectonically induced Fluxes, FN 03G0148A), and MUMM (Mikrobielle Umsatzraten von Methan in gashydrathaltigen Sedimenten, FN 03G0554A) supported by the Bundesministerium für Bildung und Forschung (Germany). Further support came from the Max-Planck-Gesellschaft (Germany). This is publication GEOTECH-~~XXX~~ of the program GEOTECHNOLOGIEN of the BMBF and the DFG.

## References

- Amann, R. I.; Ludwig, W.; Schleifer, K.-H. (1995) Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Reviews* **59**: 143-169.
- Boetius, A.; Ravensschlag, K.; Schubert, C. J.; Rickert, D.; Widdel, F.; Gieseke, A. *et al.* (2000) A marine microbial consortium apparently mediating anaerobic oxidation of methane. *Nature* **407**: 623-626.
- Boetius, A. & Suess, E. (2003) Hydrate Ridge: a natural laboratory for the study of microbial life fueled by methane from near-surface gas hydrates. accepted
- Boone, D.R.; Johnson, R.L.; Liu, Y. (1989) Diffusion of the interspecies electron carriers H<sub>2</sub> and formate in methanogenic ecosystems and its implications in the measurement of K<sub>m</sub> and H<sub>2</sub> or formate uptake. *Applied and Environmental Microbiology* **55**: 1735-1741.
- Cord-Ruwisch, R. (1985) A quick method for the determination of dissolved and precipitated sulfides in cultures of sulfate-reducing bacteria. *Journal of Microbiological Methods* **4**: 33-36.
- Daims, H.; Brühl, A.; Amann, R.; Schleifer, K.-H.; Wagner, M. (1999) The domain specific probe EUB338 is insufficient for the detection of all Bacteria: Development and evaluation of a more comprehensive probe set. *Systematic and Applied Microbiology* **15**: 601-609.
- Elvert, M.; Suess, E.; Whiticar, M. J. (1999) Anaerobic methane oxidation associated with marine gas hydrates: superlight C-isotopes from saturated and unsaturated C<sub>20</sub> and C<sub>25</sub> irregular isoprenoids. *Naturwissenschaften* **86**: 295-300.
- Elvert, M.; Boetius, A.; Knittel, K.; Jørgensen, B. B. (2003) Characterization of specific membrane fatty acids as chemotaxonomic markers for sulfate-reducing bacteria involved in anaerobic oxidation of methane. *Geomicrobiology Journal* **20**: 403-419.
- Giovannoni, S.J.; Britschgi, T.B.; Moyer, C.L.; Field, K.G. (1990) Genetic diversity in Sargasso Sea bacterioplankton. *Nature* **345**: 60-63.
- Girguis, P.R.; Orphan, V.J.; Hallam, S.J.; DeLong, E.F. (2003) Growth and methane oxidation rates of anaerobic methanotrophic Archaea in a continuous-flow bioreactor. *Applied and Environmental Microbiology* **69**: 5472-5482.

- Hallam, S.J.; Girguis, P.R.; Preston, C.M.; Richardson, P.M.; DeLong, E.F. (2003) Identification of methyl coenzyme M reductase A (mcr A) genes associated with methane-oxidizing Archaea. *Applied and Environmental Microbiology* **69**: 5483-5491.
- Harder, J. (1997) Anaerobe Oxidation von isoprenoiden Naturstoffen und Methan durch Bakterien. Habilitationsschrift an der Universität Bremen.
- Hinrichs, K-U.; Hayes, J. M.; Sylva, S. P.; Brewer, P. G.; DeLong, E. F. (1999) Methane consuming archaeobacteria in marine sediments. *Nature* **398**: 802-805.
- Hinrichs, K-U.; Summons, R. E.; Orphan, V., Sylva S. P.; Hayes, J. M. (2000) Molecular and isotopic analyses of anaerobic methane-oxidizing communities in marine sediments. *Organic Geochemistry* **31**: 1685-1701.
- Hinrichs, K.-U. & Boetius, A. (2002) The anaerobic oxidation of methane: new insights in microbial ecology and biogeochemistry. In *Ocean Margin Systems*. Wefer, G.; Billet, D.; Hebbeln, D.; Jørgensen, B. B.; Schlüter, M.; van Weering, T. (eds.) Heidelberg: Springer-Verlag, 457-477.
- Hoehler, T. M.; Alperin, M J.; Albert, D. B.; Martens, C. S. (1994) Field and laboratory studies of methane oxidation in an anoxic marine sediment: Evidence for a methanogen – sulfate reducer consortium. *Global Biogeochemical Cycles* **8**: 451-463.
- Klenk, H.-P.; Clayton, R.A.; Tomb, J.-F.; White, O.; Nealson, K.E. et al. (1997) The complete genome sequence of the hyperthermophilic, sulphate-reducing Archaeon *Archaeoglobus fulgidus*. *Nature* **390**: 364-370.
- Knittel, K.; Boetius, A.; Lemke, A.; Eilers, H.; Lochte, K.; Pfannkuche, O.; Linke, P. (2003) Activity, distribution, and diversity of sulfate reducers and other bacteria in sediments above gas hydrate (Cascadia margin, Oregon). *Geomicrobiology Journal* **20**: 269-294.
- Knoblauch, C.; Sahm, K.; Jørgensen, B. B. (1999) Psychrophilic sulfate-reducing bacteria from permanently cold arctic sediments: description of *Desulfofrigus oceanense* gen. nov., sp. nov., *Desulfofrigus fragile* sp. nov., *Desulfofaba gelida* gen. nov., sp. nov. and *Desulfotalea arctica* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* **49**: 1631-1643.

- Krüger, M.; Meyerdierks, A.; Glöckner, F. O.; Amann, R.; Widdel, F. *et al.* (2003) *In situ* tracing of the key enzyme for the anaerobic oxidation of methane. *Nature* (accepted).
- Levin, L. A. & Michener, R. H. (2002) Isotopic evidence for chemosynthesis-based nutrition of macrobenthos: The lightness of being at Pacific methane seeps. *Limnology and Oceanography* **47**: 1336-1345.
- Linke, P. & Suess, E. (2000) RV Sonne cruise report SO148. *TECFLUX-II-GEOMAR Report* **98**: 122.
- Meyer-Reil, L. A. (1983) Benthic response to sedimentation events during autumn to spring at a shallow water station in the northwestern Kiel Bight. *Marine Biology* **77**: 247-256.
- Michaelis, W.; Seifert, R.; Nauhaus, K.; Treude, T.; Thiel, V.; Blumenberg, M. *et al.* (2002) Microbial reefs in the Black Sea fueled by anaerobic oxidation of methane. *Science* **297**: 1013-1015.
- Niemann, H.; Elvert, M.; Nadalig, T.; Lösekann, T.; Boetius, A. (2003) Biomarkers indicate narrow layers of anaerobic and aerobic methanotrophy in sediments of Håkon Mosby Mud Volcano. *Geobiology*: submitted.
- Nauhaus, K.; Boetius, A.; Krüger, M.; Widdel, F. (2002) *In vitro* demonstration of anaerobic oxidation of methane coupled to sulphate reduction in sediments from a marine gas hydrate area. *Environmental Microbiology* **4**: 296-305.
- Orphan, V. J.; House, C. H.; Hinrichs, K.-U.; McKeegan, K. D.; DeLong, E. F. (2001) Methane-consuming archaea revealed by directly coupled isotopic and phylogenetic analyses. *Science* **293**: 484-487
- Orphan, V. J.; House, C. H.; Hinrichs, K.-U.; McKeegan, K. D.; DeLong, E. F. (2002) Multiple archaeal groups mediate methane oxidation in anoxic cold seep sediments. *Proceedings of the National Academy of Science* **99**: 7663-7668.
- Overmann, J.; Tuschak, C.; Frössl, J.; Sass, H. (1998) The ecological niche of the consortium "*Pelochromatium roseum*". *Archives of Microbiology* **169**: 120-128.
- Pancost, R. D.; Sinninghe Damsté, J. S. ; de Lint, S.; van der Maarel, M. J. E. C.; Gottschal, J. C.; the Medinaut Shipboard Scientific Party (2000) Biomarker evidence for widespread anaerobic methane oxidation in Mediterranean sediments by a consortium

- of methanogenic archaea and bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **66**: 1126-1132.
- Pedersen, K.; Arlinger, J.; Ekendahl, S.; Hallbeck, L. (1996) 16S rRNA gene diversity of attached and unattached bacteria in boreholes along the access tunnel to the Äspö hard rock laboratory, Sweden. *FEMS Microbiology Ecology* **19**: 249-262.
- Pernthaler, A.; Pernthaler, J.; Amann, R. (2002) Fluorescence in situ hybridization and catalyzed reporter deposition for identification of marine bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **68**: 3094-3101.
- Purdy, K. J.; Nedwell, D. B.; Embley, T.M. (2002) Analysis of the sulfate-reducing bacterial and methanogenic archaeal populations in contrastin Antarctic sediments. Unpublished.
- Reeburgh, W. S. (1996) "Soft spots" in the global methane budget In: Lidstrom, M. E. & Tabita, F. R. (eds) *Microbial growth on C<sub>1</sub> compounds*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp 334-352.
- Sahm, K.; Knoblauch, C.; Amann, R. (1999) Phylogenetic affiliation and quantification of psychrophilic sulfate-reducing isolates in marine arctic sediments. *Applied and Environmental Microbiology* **65**: 3976-3981.
- Schink, B. (1997) Energetics of syntrophic cooperation in methanogenic degradation. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **61**: 262-280.
- Schink, B. & Stams, A. J. M. (2001) Syntrophism among prokaryotes. In *The Prokaryotes, an Evolving Electronic Resource for the Microbiological Community*. Dworkin, M.; Falkow, S.; Rosenberg, E.; Schleifer, K.-H.; Stackebrandt, E. (eds). Heidelberg: Springer Science Online. ([www.prokaryotes.com](http://www.prokaryotes.com)).
- Snaidr, J.; Amman, R.; Huber, I.; Ludwig, W.; Schleifer, K.-H. (1997) Phylogenetic analysis and in situ identification of bacteria in activated sludge. *Applied and Environmental Microbiology* **63**: 2884-2896.
- Sørensen, K. B.; Finster, K.; Ramsing, N. B. (2001) Thermodynamic and kinetic requirements in anaerobic methane oxidizing consortia exclude hydrogen, acetate and methanol as possible shuttles. *Microbial Ecology* **42**: 1-10.

- Strunk, O.; Gross, O.; Reichel, B.; May, M.; Hermann, S. *et al.* (1998) ARB: a software environment for sequence data. <http://www.micro.biologie.tu-muenchen.de>  
Department of Microbiology Technische Universität München, Munich, Germany.
- Teske, A.; Hinrichs, K.-U.; Edgcomb, V.; Gomez, A. D. V.; Kysela, D. *et al.* (2002) Microbial diversity of hydrothermal sediments in the Guyamas Basin: Evidence for anaerobic methanotrophic communities. *Applied and Environmental Microbiology* **68**: 1994-2007.
- Thiel, V.; Peckmann, J.; Seifert, R.; Wehrung, P.; Reitner, J.; Michaelis, W. (1999) Highly isotopically depleted isoprenoids: molecular markers for ancient methane venting *Geochimica et Cosmochimica Acta* **63**: 3959-3966.
- Valentine, D. L. & Reeburgh, W. S. (2000) New perspectives on anaerobic methane oxidation. *Environmental Microbiology* **2**: 477-484.
- Ward, D.M.; Weller, R.; Bateson, M.M. (1990) 16S rRNA sequences reveal numerous uncultured microorganisms in a natural community. *Nature* **345**: 63-65.
- Widdel, F. & Bak, F. (1992) Gram negativ mesophilic sulfate-reducing bacteria. In *The Prokaryotes*. Balows, A.; Trüper, H. G.; Dworkin, M.; Harder, W.; Schleifer, K.-H. (eds). New York: Springer, 3352-3378.
- Yamamoto, S.; Alcauskas, J. B.; Crozier, T. E. Solubility of methane in distilled water and seawater. *Journal of Chemical and Engineering Data* **21**: 78-80

## Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Widdel für die Überlassung dieses spannenden Themas und die Betreuung während der Bearbeitung.

Frau Prof. Boetius danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens sowie für die viele wertvolle Unterstützung, die unzähligen Diskussionen und Anregungen, und auch die vielen aufmunternden und lustigen Momente.

Ein großes Dankeschön gebührt Tina Treude, die mich in das Leben und Arbeiten auf dem Schiff eingeführt hat, und die auch im Alltag in Bremen bei allen Höhen und Tiefen ein offenes Ohr und den nötigen Galgenhumor hatte. Jens Harder möchte ich für die vielen beantworteten Fragen und die Unterstützung beim Aufbau des GC's danken. Die fachliche und die menschliche Unterstützung der jetzigen und ehemaligen MitarbeiterInnen der Abteilung Mikrobiologie haben zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Ganz besonders möchte ich mich bei den Bewohnern der Büroinsel 2131, Hang, Olav und Simon, für die schöne Zeit bedanken. Ich werde Euch vermissen. Melanie Albrecht, die mich lange Zeit tatkräftig und kompetent bei der Laborarbeit unterstützt und unzählige Konsortien gezählt hat, danke ich für die Zusammenarbeit. Auch in den anderen Abteilung gab es viele Menschen, die mich auf die ein oder andere Weise wertvoll unterstützt haben, vielen Dank! Bernd Stickfort danke ich für die Beschaffung diverser Literatur, obwohl er mich oft selbst zum kopieren in die Unibibliothek geschickt hat. Allen Angehörigen der Verwaltung und der Werkstätten danke ich für ihre Unterstützung. Ein besonderer Dank geht auch an alle Mitreisenden der beiden Ausfahrten, an denen ich teilnehmen konnte, für ihre Hilfe und Unterstützung bei der Probenahme und für die schöne Zeit auf See. Die daraus entstandenen Fächer übergreifenden Kontakte haben zu vielen spannenden Diskussionen und Anregungen geführt.

Meiner Familie, insbesondere meinen Eltern, danke ich für die Unterstützung und den positiven Zuspruch. Ganz besonders möchte ich mich bei meinem (stief)Vater bedanken, der mir die letzten neun Monate der Doktorarbeit Unterschlupf gewährte.

Ein ganz spezieller Dank geht an Christian Sichau, der mich unaufhörlich liebevoll und auch kritisch unterstützt hat.