Vergleichende biogeochemische und genetische Analysen zur mikrobiellen Silikatverwitterung in marinen Sedimenten

Lars Bremer

IFM-GEOMAR

Vergleichende biogeochemische und genetische Analysen zur mikrobiellen Silikatverwitterung in marinen Sedimenten

Diplomarbeit

im Studiengang Biochemie/ Molekularbiologie
an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

Lars Bremer

Angefertigt am
Leibniz-Institut für Meereswissenschaften (IFM-GEOMAR)
und
dem Institut für Allgemeine Mikrobiologie
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

2010

Referentin: **Prof. Dr. Tina Treude**

Koreferentin: **Prof. Dr. Ruth Schmitz-Streit**

Wenn Du ein Schiff bauen willst,
so trommle nicht Männer zusammen, um Holz zu beschaffen,
Werkzeuge vorzubereiten, Aufgaben zu vergeben und die Arbeit einzuteilen,
sondern lehre die Männer die Sehnsucht nach dem weiten endlosen Meer.
(Antoine de Saint-Exupéry, Die Stadt in der Wüste)

MEINER FAMILIE

Inhaltsverzeichnis

1 Zusammenfassung **1**

1.1 Abstract . . . 1

1.2 Zusammenfassung . . . 2

1.3 Problemstellung . . . 4

1.3.1 Silikatverwitterung . . . 5

1.3.2 Redoxzustände im Sediment . . . 7

2 Material und Methoden **9**

2.1 Habitatcharakterisierung . . . 9

2.1.1 Sakhalin (Flussmündung) . . . 9

2.1.2 Peru (Auftriebsgebiet, OMZ) . . . 10

2.1.3 Okinawa (CO_2-Seep) . . . 11

2.2 Medien . . . 12

2.2.1 Salzwassermedium für methanogene Archaeen . . . 12

2.2.2 Salzwassermedium für Sulfatreduzierer . . . 13

2.2.3 Salzwassermedium für Eisenreduzierer . . . 13

2.2.4 Salzwassermedium für Fermentierer . . . 13

2.3 Versuchsaufbau . . . 14

2.4 Kernbeprobung . . . 15

2.5 Schematischer Versuchsaufbau . . . 15

2.5.1 Equilibrierungsphase . . . 15

2.5.2 Inkubationsphase . . . 17

2.5.3 Silikate . . . 17

2.6 Düngung . . . 18

3 Messverfahren und nicht-molekulare Bildgebung **19**

3.1 Messungen periodisch . . . 19

3.1.1 Sulfid . . . 19

3.1.2 CH_4 . . . 19

3.1.3 Eisen . . . 20

3.1.4 CO_2 . . . 21
3.2 Messungen, aperiodisch . . . 21
3.2.1 Silikat . . . 22
3.2.2 Organische Säuren . . . 22
3.2.3 Schlüsselelemente . . . 22
3.2.3.1 Probenvorbereitung . . . 23
3.2.3.2 Standardreihe . . . 23
3.2.3.3 Proben . . . 24
3.2.3.4 Messung . . . 24
3.2.3.5 Mathematische Korrektur . . . 24
3.3 Rasterelektronenmikroskopie . . . 24

4 Molekulare Analysen und Bildgebung 27
4.1 rDNA-Analyse . . . 27
4.1.1 Isolierung von ribosomaler DNA . . . 27
4.1.2 Konzentrationsbestimmung der Nukleinsäuren . . . 29
4.1.3 Agarose-Gelelektrophorese . . . 29
4.1.4 rDNA-Polymerase-Kettenreaktion . . . 29
4.1.5 Gelextraktion . . . 31
4.1.6 Ligation . . . 31
4.1.7 Transformation in *E. coli* . . . 32
4.1.8 Kolonie-PCR . . . 33
4.1.9 Sequenzierung . . . 33
4.2 18S rDNA-Analyse . . . 34
4.3 Bioinformatische Auswertung . . . 34
4.4 CARD-FISH . . . 34

5 Ergebnisse 38
5.1 Analysen, periodisch . . . 38
5.1.1 Sulfid . . . 38
5.1.2 Methan . . . 39
5.1.3 Eisen . . . 39
5.1.4 CO_2 . . . 42

5.2 Analysen, aperiodisch . . . 44
5.2.1 Silikat . . . 44
5.2.2 Organische Säuren . . . 47
5.2.3 Elementanalysen . . . 50
5.3 DNA Isolierung . . . 53
5.3.1 16S rDNA-PCR . . . 53
5.3.2 18S-rDNA-PCR . . . 55
5.3.3 Mikrobielle Diversität . . . 55
5.4 CARD-FISH . . . 59
5.5 REM . . . 64

6 Diskussion 80

6.1 Phylogenetische Diversität . . . 80
6.1.1 Sedimente . . . 80
6.1.2 Sakhalin, Sulfatreduziererzone . . . 80
6.1.3 Sakhalin, Methanogenenzone . . . 81
6.1.4 Peru . . . 82
6.1.5 Okinawa . . . 84
6.2 Sulfid . . . 84
6.3 Methan . . . 85
6.4 CO_2 . . . 85
6.5 Eisen . . . 86
6.6 Silikat . . . 87
6.7 Organische Säuren . . . 88
6.8 Schlüsselelemente . . . 88
6.9 REM . . . 91
6.10 CARD-FISH . . . 92

7 Methodendiskussion 93

7.1 Inkubationssystem . . . 93
7.1.1 Sedimente . . . 94
7.1.2 Medien . . . 94
7.1.3 Beprobung . . . 95

7.1.4 Düngung 95
7.1.5 Analysemethoden 95
7.2 16S rDNA-Analyse 96
7.3 CARD-FISH 96
7.4 REM 97
7.5 Technische Bewertung 98
7.6 Abschlussbetrachtung 99

8 Perspektiven **100**

9 Anhang **102**
9.1 Abkürzungsverzeichnis 102
9.2 Chemikaliennachweis 103
9.3 Enzyme und Kits 105
9.4 Gerätenachweis 105

10 Literaturverzeichnis **106**

11 Danksagung **115**

Eidesstattliche Erklärung **116**

1 Zusammenfassung

1.1 Abstract

Chemical silicate weathering is a well known and frequently described process. Silicate weathering has impacts on the global CO_2-system being a sink for CO_2. Experimental work was carried out with marine sediments from three different locations and different redox zones. Sediment samples were collected in the Sakhalin Trough, the Okinawa Trough and the shelf region off Peru beforehand. The experimental strategy combined molecular biological, biogeochemical and microbiological methods. Incubation experiments have been carried out anaerobically under sulfate reducing (SR), methanogenic (MG), iron-reducing (Fe) and fermenting (Ferm) conditions, using specially designed microcosms. After a reactivation- and pre-incubation phase each slurry has been divided into three aliquots. One aliquot was incubated as a control (X), the other two aliquots were incubated either in the presence of bytownite (B) or orthoklas (O). During the incubation microbial growth was monitored by the analysis of microbial products like sulfide from microbial sulfate reduction or methane from methanogenesis. As a central indicator for silicate weathering the concentration of dissolved silicate was measured. Furthermore, the concentration of short-chain volatile fatty acids (VFA) and cations was monitored. At the end of the incubation period incubated silicates were recovered form the experiments and analyzed by SEM and CARD-FISH to find evidence for microbe-mineral-interactions or altered mineral surfaces.

The most striking evidence for silicate weathering was gained by SEM analysis. Silicate surfaces were altered morphologically. As indicators for weathering reactions rough surfaces, partly dissolved areas, asymmetric crystal edges and secondary formed amorphous structures were found.

The dissolution of silicates was assumed to lead to an increase of dissolved silica. An increase in the Si-concentration has been detected for all redox conditions. A contamination caused by the glass walls of the microcosms could be ruled out by comparison to sediment-free media controls except for incubations with iron reducer medium. Here, a rise in the dissolved silica concentration has been registered in the sediment-free media controls.

The microbial reduction of structural coordinated Fe(III) could cause geochemichal alterations of silicates [Kostka *et al.*, 1996]. Iron reducing organisms are therefore assumed to propagate

weathering reactions. . *Shewanella putrefaciens* has been described as an bacteria capable of iron reduction [Bretschger *et al.*, 2007]. Phylogenetic analysis and CARD-FISH imaging which have been carried out in this study also confirmed the presence of *Shewanella*. However, the determination of Fe in the media shows only a weak increase. This effect my originate in a close coupling of the iron- and sulfur cycle. After the reduction of sulfate to sulfide, sulfide could react with metal cations to insoluble metal sulfide and would no longer being detected by the analytical method. A corruption of the measured data is therefore possible.

Fermenting bacteria may produce VFAs. Those are capable to accelerate silicate weathering [Stillings *et al.*, 1996; Pokrovsky *et al.*, 2009]. A variety of VFAs has been detected in the microcosms incubated with fermenting medium in the presence of sediment. Those findings correlate with the SEM images of the silicates incubated in peruvian sediment.

A main focus of microbes capable of silicate weathering lies upon bacterias. It has been shown, that archeea dominate marine sediments in depth greater than 10 cm [Lipp *et al.*, 2008]. Due to the unsuccessful attempts to cultivate archeea few is known about their impact on biogeochemical reactions. An impact on silicate weathering could be neither denied, nor proofed.

The results obtained in this diploma thesis show, that marine sediments are phylogenetic diverse and metabolically active. However, the complex interactions of organisms and there effects on biogeochemical fluxes and conversions could not finally be resolved. The results strongly suggest that silicate weathering is to some extent promoted as a consequence of microbial activity. For following studies it is suggested to develop factorial designed incubation experiment. The global measurement of parameters throughout all microcosms is highly recommended.

1.2 Zusammenfassung

Chemische Silikatverwitterung ist ein gut beschriebener Prozess, der durch die Bindung von CO_2 klimarelevanten Einfluss hat. Für die vorliegende Diplomarbeit wurden Sedimentproben aus dem Sakhalin Trog, dem peruanischen Auftriebsgebiet sowie dem Okinawa Trog analysiert. Die Analyse der Sedimente umfasste eine Beschreibung der phylogenetischen Diversität sowie Inkubationsexperimente zur Beschreibung biogeochemischer Prozesse. Die Entwicklung von anaeroben Mikrokosmen stellte die technische Grundlage für die Inkubationsexperimente dar. In den Mikrokosmen wurden Sedimentproben mit vier verschiedenen Medien versetzt. Dabei fanden neben

Sulfatreduzierer-(SR) und Methanogenenmedium (MG), auch speziell auf Eisenreduzierer (Fe-Red.) und Fermentierer (Ferm) abgestimmte Medien Anwendung. Nach einer Equilibrierungsphase wurde jeder dieser *Slurries* (Sediment/ Medium-Gemisch) in drei Unterproben geteilt. Eine verblieb als Kontrolle (X), die beiden Anderen wurden entweder in der Anwesenheit der Silikate Bytownit (B) oder Orthoklas (O) inkubiert. Während dieser Inkubationsphase wurde bakterielles Wachstum über Akkumulationen metabolischer Produkte wie Sulfid oder Methan überwacht. Als zentrale Parameter der Silikatverwitterung wurden die Silikatkonzentration, organische Säuren sowie Metall- und Elementkonzentrationen in Medium und Sediment in bestimmt. Im Anschluss an die Inkubationsphase wurden die Silikate entnommen und mit Hilfe von CARD-FISH und REM mit Hinblick auf Mineral-Mikroben-Interaktion, sowie Oberflächenveränderungen der Silikate, analysiert.

Der deutlichste Nachweis für Silikatverwitterung konnte über REM-Aufnahmen erbracht werden. Es wurden morphologisch stark veränderte Kristalloberflächen nachgewiesen. Die Kristallflächen zeigen neben einer stark aufgerauten Oberfläche, herausgelösten Kristallstücken und asymmetrischen Kristallkanten auch amorphe, sekundäre Strukturen, die durch Präzipitate hervorgerufen sein könnten. Auf mehreren Kristalloberflächen konnten zudem fixierte Mikroorganismen nachgewiesen werden.

Das Auflösen der Silikatkristallstruktur während der Verwitterungsprozesse führte zu einer Silikatfreisetzung. Es konnte in allen Medien ein Anstieg der Si-Konzentration gemessen werden. Eine Kontamination durch die Glaswände der Mikrokosmen konnte durch sedimentfreie Medienkontrollen ausgeschlossen werden. Ausgenommen davon sind die mit Eisenreduzierermedium inkubierten Mikrokosmen, die auch in den Kontrollen eine Si-Freisetzung zeigten.

Die mikrobielle Reduktion von strukturell koordiniertem Fe(III) zu Fe(II) kann zu geochemischen Veränderungen im Kristall und somit zur Verwitterung führen [Kostka *et al.*, 1996]. In diesem Zusammenhang fällt eisenreduzierenden Mikroorganismen eine mögliche Schlüsselrolle in der Silikatverwitterung zu. *Shewanella putrefaciens* wurde z.B. als Eisenreduzierer beschrieben [Bretschger *et al.*, 2007]. Phylogenetische Untersuchungen und CARD-FISH-Ergebnisse bestätigen die Anwesenheit von *Shewanella*. Die Messung von Fe im Medium zeigte einen relativ schwachen Anstieg von Eisen, teilweise fielen die Werte sogar im Vergleich zu den Werten zu Inkubationsbeginn ab. Hier kann eine Ursache in der Kopplung von Eisen- und Schwefelkreislauf liegen. Wird Sulfat zu Sulfid reduziert kann Sulfid mit Metallen zu unlöslichen Metallsulfiden reagieren und

somit die Analyse verfälschen.

Zusätzlich zu der Eisenreduktion als Verwitterungsfaktor können auch organische Säuren die Auflösung von Silikaten bedingen [Stillings *et al.*, 1996; Pokrovsky *et al.*, 2009]. Organische Säuren können als Produkt mikrobieller Fermentation entstehen. In den mit Fermentierermedium inkubierten Mikrokosmen wurden diverse organische Säuren wie Ethansäure, Propansäure und teilweise Milchsäure nachgewiesen. Im Vergleich mit den REM-Bildern zeigen sich starke Verwitterungserscheinungen an den mit Fermentierermedium inkubierten Silikaten. Die Verwitterungsreaktionen waren auf den REM-Bildern der in peruanischem Sediment inkubierten Kristalle am deutlichsten.

Ein Hauptaugenmerk bei der Zuordnung von metabolischen Vorgängen zu biogeochemischen Effekten liegt auf bakteriellen Leistungen. Aktuelle Schätzungen gehen jedoch davon aus, dass mit 90 Pg Gesamtmasse Archaeen das Sediment dominieren und bereits ab einer Sedimenttiefe von 10 cm den größten Anteil an mirkobiellem Leben stellen [Lipp *et al.*, 2008]. Da die meisten Archaeen bisher nicht kultivierbar sind konnten kaum Aussagen über biogeochemisch relevanten Prozesse gemacht werden. Ein Einfluss auf Silikatverwitterung kann daher zum gegenwärtigen Zeitpunkt weder ausgeschlossen noch bestätigt werden.

Allgemein konnte gezeigt werden, dass marine Sedimente phylogenetisch divers und metabolisch aktiv sind. Das komplexe Zusammenspiel von Organismen und metabolischen Raten bedarf dabei weiterer Forschung auf Basis variabler, faktorieller Ansätze. Hierzu zählt auch die Aufnahme von CO_2-Messungen für die Gesamtheit der Proben. Zukünftige Arbeiten können dabei auf eine neue Gaschromatographen-Säule zurückgreifen, die u.a. die parallele Detektion von CH_4 und CO_2 ermöglicht.

1.3 Problemstellung

Vor dem Hintergrund der aktuellen Klimadebatte, sowie der letzten Klimakonferenz in Kopenhagen wird deutlich, dass neue wissenschaftlich abgesicherte Methoden benötigt werden, um den massiven Folgen eines steigenden CO_2-Ausstoßes gerecht zu werden. Laut dem Jahresbericht des Intergovernmental Panel of Climat Change (IPCC) gilt CO_2 als das wichtigste anthropogene Treibhausgas, dessen Emission in dem Zeitraum zwischen 1970 und 2004 um 80% auf 38 Pg pro Jahr gestiegen ist. Der Trend zeigt dabei einen deutlich stärkeren jährlichen Zuwachs in

den letzten Jahren [Pachauri *et al.*, 2007]. Dabei gilt zu bedenken, dass CO_2 nur eins der Gase ist, die als klimarelevant eingestuft werden. Die in Kopenhagen beschlossene Reduktion der Emissionen [Delegationen, 2009], selbst wenn sie nicht vollständig den Empfehlungen des IPCC folgt, bedarf einer globalen und vielschichtigen Herangehensweise. CO_2-Limitationen und umweltfreundlichere Technologien sind dabei eine grundlegende Voraussetzung. Der Ausstoß klimarelevanter Treibhausgase wird sich jedoch nicht absehbar völlig verhindern lassen. Hier sind diverse Möglichkeiten der Sequestrierung oder des sog. *Geo-Engineerings* gefragt, die teilweise kontrovers diskutiert werden. Wissenschaftliche Ansätze Gas zu verpressen, in Aquifiern einzulagern, durch Ozeandüngung zu binden oder in Gashydraten thermodynamisch stabil einzulagern werden z.Zt. erforscht. Beispielhaft sei hier das SUGAR-Projekt (u.a. IFM-GEOMAR) oder LOHAFEX (Alfred-Wegener-Institut) genannt. Hinzu kommt die Möglichkeit bei der Verwitterung von Silikat zu Carbonaten und Tonmineralien CO_2 zu binden. Der eigentlich destruktive Prozess einer Verwitterung kann dabei als potentiell mikrobiell katalysierte Umwandlungsreaktion verstanden werden, der rein formal eine CO_2-Senke von 5-20 Tmol pro Jahr darstellt [Wallmann *et al.*, 2008]. Modellierungen nach wird global 19-46 Tmol Silikat pro Jahr verwittert [Hilley and Porder, 2008].

Der Fokus dieser Diplomarbeit liegt daher auf der grundsätzlichen Frage, ob mikrobielle Silikatverwitterung in marinen Sedimenten erfolgt und wie sie charakterisierbar ist.

1.3.1 Silikatverwitterung

Verwitterung kann allgemein als die Summe aller physikalischen, biologischen und chemischen Prozesse aufgefasst werden, die zu einer Zersetzung oder Umwandlung von Gestein führen. Es entstehen sog. *Tonminerale*. Dabei wird zum Einen CO_2 gebunden, zum Anderen werden Kationen und HCO_3^- freigesetzt [Emerson and Hedges, 2008].
Terrestrische Verwitterungsprozesse sind schon lange Gegenstand der Forschung und im Zusammenhang mit Errosion [Winslow, 1884] oder Architektur [Goretzki *et al.*, 1987] beschrieben. In terrestrischen Habitaten wurde zudem der Einfluss von Hyphen auf Verwitterungsreaktionen diskutiert, wobei Flechten ein extrazelluläres, saures Gel auf mineralischen Oberflächen bilden [Barker and Banfield, 1996]. Das Verwitterungsprozesse in marinen Systemen auftreten und einen Einfluss auf Ionen und Elementkomposition haben, wurde erst relativ spät beschrieben [Friis, 1978; Edmond *et al.*, 1979]. Dabei richtete sich das Hauptaugenmerk auf Silikate und vulkanische Glase [Staudigel and Hart, 1983; Krumbein *et al.*, 1991]. Der Einfluss von mikrobiellen Prozessen auf

marine Glase findet immer wieder Erwähnung in der Literatur [Staudigel *et al.*, 2008]. Gegenstand der meisten Untersuchungen ist dabei die mikrobielle Fertigkeit nährstoffarme und relativ feste Stoffe, wie eben vulkanisches Glas, gezielt zu zersetzten. Ein Einfluss von eukaryotischen Prozessen auf Silikatverwitterung in marinen Sedimenten ist bisher nicht eindeutig beschrieben.
Die Änderung des Redoxzustandes oder der Austausch von Ionen zwischen Festphase und umgebendem Medium kann dabei zu strukturellen Umlagerungen des Kristalls oder zu einer partiellen Auflösung der Kristallstruktur führen [Ribeiro *et al.*, 2009]. Mikrobiell unterstütze Umkristallisationen sind gegenüber abiotischen Reaktionen deutlich beschleunigt [Kim *et al.*, 2004]. Dabei stehen sich grundsätzlich zwei Hypothesen gegenüber: Zum einen besteht die Möglichkeit, dass Mikroben aktiv Kontakt zu Silikaten suchen und nach Kontakt organische Säuren oder Enzyme sezernieren, die die Silikatmatrix auflösen und so Nährstoffe (z.B. Phosphat) und weitere Ionen aus der Matrix freisetzen [Bennett *et al.*, 2001]. Hierfür wäre neben einer komplexen Perzeption auch eine zielgerichtete Kontrolle der Sekretion neben engem Kontakt zum Substrat seitens der Mikroorganismen nötig. Auf der anderen Seite besteht die Möglichkeit, dass Mikroben in organikreichen Sedimenten über eine Ansäuerung passiv, als Nebeneffekt ihres eigenen Metabolismus', Nährstoffe oder Ionen aus den Silikaten freisetzen. Der Konsens beider Hypothesen liegt demnach in einer Auflösung der Silikatkristallstruktur durch mikrobiell produzierte Liganden oder die Etablierung einer Mikroumgebung. Letztere könnte entsprechend ersten Laborexperimenten an Reinkulturen durch ein von der Umgebung abweichendes pH-Milieu [Welch and Ullman, 1993], eine durch Chelate veränderte Ionenkomposition oder Exoenzyme [Barker *et al.*, 1998] gekennzeichnet sein. Die theoretische und rein stoffliche Reaktionsgleichung für Silikatverwitterung lautet:

$$\mathrm{CaSiO} + 2\mathrm{H_2O} + 2\mathrm{CO_2} \longrightarrow \tag{1.1}$$

$$\mathrm{Ca_2^+} + 2\mathrm{HCO_3^-} + 2\,\mathrm{H^+} + \mathrm{SiO_3^{2+}} \longrightarrow \tag{1.2}$$

$$\mathrm{CaCO_3} + \mathrm{SiO_2 \cdot H_2O} + \mathrm{CO_2} \tag{1.3}$$

[Wallmann *et al.*, 2008]. Wie bereits in einem früheren Modell gezeigt werden konnte, sind CO_2-Gehalt der Atmosphäre und Carbonatbildung direkt voneinander abhängig [Berner *et al.*, 1983]. Die Überlegung das o.g. Verwitterungsreaktion als CO_2-Senke zu verstehen ist, gehen auf Arbeiten von H.C. Urey im Jahr 1962 zurück [Urey, 1962].

1.3.2 Redoxzustände im Sediment

Zur mikrobiellen Silikatverwitterung befähigte Mikroorganismen könnten sowohl aus der energetisch hochwertigen Eisenreduktion, Sulfatreduktion, Methanogenese oder Fermentation Energie gewinnen. Um diesen unterschiedlichen metabolischen Prozessen Rechnung zu tragen wurden in den Mikrokosmen vier verschiedene, selektive Medien verwendet. Der folgende Abschnitt gibt einen kurzen Überblick über die wichtigsten Standardredoxreaktionen, die in marinen Systemen einen direkten Einfluss auf die Silikatverwitterung haben könnten und deren Parameter im Rahmen der Diplomarbeit berücksichtigt wurden.

Etwa 90% des organischen Materials aus der euphotischen Zone wird innerhalb der Wassersäule wieder abgebaut. Von den verbleibenden 10% die den Meeresboden erreichen werden wiederum nur etwa 10% dauerhaft im Sediment begraben. Das organische Material, dass effektiv den Meeresboden erreicht ist dort die treibende Kraft für eine Vielzahl von Reaktionen. Am deutlichsten wird dieser Effekt, wenn punktuell ein hoher Organikeintrag stattfindet, wie dieses der Fall bei z.B. Walkadavern ist [Treude *et al.*, 2009]. Der Ablauf der dann stattfindenden Prozesse ist thermodynamisch determiniert und kann über die freie Enthalpie kategorisiert werden. Prozesse mit einem hohen $\Delta G^0{}_r$ sind dabei thermodynamisch bevorzugt. Allgemein ist organisches Material, das meist in Form von komplexen Molekülen vorliegt, bei Standarddruck und -temperatur reduziert und thermodynamisch metastabil. Während des Abbaus werden die Stoffe mehrfach oxidiert, die freie Enthalpie des Systems somit verringert. Klassische Elektronenakzeptoren, die auch in dieser Diplomarbeit behandelt wurden, sind dabei Fe(III), $SO_4{}^{2-}$ und im Bezug auf Fermentation auch das organische Material selbst. Aerobe Oxidation, mit O_2 als Elektronenakzeptor, die die höchste freien Enthalpie aufweist spielt in den vorliegenden Analysen auf Grund der Sedimenttiefe keine Rolle. Eine Auswahl der wichtigsten Reaktionen sowie ihrer freien Enthalpie können der folgenden Tabelle [Tab. 1.1] entnommen werden:

Tab. 1.1: Freie Enthalpien von Standard-Redoxreaktionen in marinen Sedimenten Die Tabelle zeigt die Standard-Redoxreaktionen mit der zugehörigen freien Enthalpie. Die Werte können je nach Literaturbezug leicht schwanken [Emerson and Hedges, 2008]. Bei den aufgeführten Reaktionsgleichungen handelt es sich um exemplarische Reaktionen, die chemischen Spezies können je nach Sediment und biogeochemischem Gesamtkontext variieren.

Reaktion	$\Delta G^0{}_r$ [kJ mol^{-1}]
Denitrifikation $4e^- + 4{,}8H^+ + 0{,}8\ NO_3{}^- \longrightarrow 0{,}4\ N_2 + 2{,}4\ H_2O$	-508,4
Mn(III)-Reduktion $4e^- + 8H^+ + 2MnO_{2(s)} \longrightarrow 2\ Mn^{2+} + 4\ H_2O$	-502,7
Fe(III)-Reduktion $4e^- + 12H^+ + 2Fe_2O_{3(s)} \longrightarrow 4\ Fe_2^+ + 6\ H_2O$	-281,4
Sulfatreduktion $4e^- + 5H^+ + 0{,}5\ SO_4{}^{2-} \longrightarrow 0{,}5\ H_2S_{(g)} + 2\ H_2O$	-147,1
Methanogenese $4e^- + 4H^+ + 0{,}5\ CO_{2(g)} \longrightarrow 0{,}5\ CH_{4(g)} + H_2O$	-93,58

Mikroorganismen reduzieren die Substrate in absteigender Reihenfolge der freien Enthalpie. Je höher die Energieausbeute pro Mol oxidiertem Kohlenstoff ist, des

Mikroorganismen bevorzugen die Reaktionen, die den höchsten Energieertrag in Abhängigkeit von der Umgebung liefern. Ein energetisch höherwertiger Prozess wird demnach einen energetisch niedrigeren Prozess stets übertreffen [Froelich *et al.*, 1979].

2 Material und Methoden

In diesem Kapitel werden neben dem Versuchsablauf auch die Sedimente mit ihrem biogeochemischen Hintergrund beschrieben. Die experimentell ermittelten Datensätze der vorliegenden Diplomarbeit basieren auf Sedimentproben die während drei Expeditionen aus marinen Habitaten gewonnen werden konnten. Die Sedimente stammen aus dem Sakhalin Trog, dem Okinawa Trog und der Küste vor Peru.

2.1 Habitatcharakterisierung

Die hier dargestellte Datensätze basieren nicht auf Messungen die im Zusammenhang mit dieser Diplomarbeit entstanden sind, sondern sind, sofern nicht explizit anders angegeben, den Fahrtberichten der entsprechenden Expeditionen entnommen. Sie sollen hier primär einen erweiterten Einblick in die Habitate erlauben, denen die Sedimente entnommen wurden, um die anschließenden Experimente besser interpretieren zu können. Im Folgenden werden diese Habitate kurz charakterisiert

2.1.1 Sakhalin (Flussmündung)

Während der Expedition SO178 (KOMEX Projekt) vom 21. Juli - 03. September 2004 wurde in der Position 144°14,232’ E und 53°50,000’ N in 771 m Wassertiefe ein 24,6 m langer Kern per Kolbenlot gewonnen. Die Probenstelle lag im südwestlichen Bereich der See von Okhotsk und wird sedimentologisch von dem Fluss Amur beeinflusst der westlich der Nordspitze der Insel Sakhalin in den Tatrensund mündet [Nakatsuka *et al.*, 2004]. Variationen des terrestrischen Eintrags sind in den Sedimenten aufgezeichnet und an klimatische Veränderungen, wie Eiszeiten koppelbar [Nurnberg and Tiedemann, 2004]. Die See von Okhotsk unterliegt starken saisonalen, klimatischen und somit bilogischen Schwankungen und ist bis März fast vollständig von Eis bedeckt, während im Frühjahr und Herbst hohe starke Primärproduktion gemessen werden kann [Broerse *et al.*, 2000]. Auch hier ist eine der treibenden Kräfte der Amur. Er stellt im späten Frühjahr auf Grund von Schneeschmelze und Tauen der Böden, im Spätsommer als Folge des Monsuneinflusses einen deutlichen Stoffeintrag in die beprobte Region dar [Oki *et al.*, 1995]. Da das Sediment entsprechend sehr organikreich und terrigen beeinflusst ist, bietet es ein potentiell stark silikatverwitterndes Milieu. Proben für Porenwasseranalyse und geochemische Parameter wurden noch

an Bord genommen und bearbeitet [Wallmann *et al.*, 2008]. Bereits in einer Sedimenttife von 5 m war kein Sulfat mehr im Porenwasser nachweisbar. Die Abwesenheit von Sulfat im Sediment dient als Indikator für einen starken Abbau von organischem Material [Wallmann *et al.*, 2006]. Die Sulfat-Methan-Übergangszone lag zwischen 3 und 6 m Sedimenttiefe. Der Kern wurde halbiert und aerob im Kernlager des IFM-GEOMARs bei 4°C archiviert. Da sich das geochemische Profil im Sediment entsprechend der dominanten mikrobiellen Prozesse mit der Tiefe änderte wurde dieser Kern in zwei Tiefen beprobt. Die Sulfatreduziererzone wurde in einer Kerntiefe von 66 bis 70 cm beprobt, die methanogene Zone entsprechend tiefer zwischen 762 und 765 cm. Beide Zonen wurden zuvor an Hand vorliegender Analysen determiniert [Wallmann *et al.*, 2008]. Das Sediment war optisch homogen, sehr kompakt und einfarbig olivgrün, die Lagerbedingungen für mikrobiologische Untersuchungen herausfordernd.

2.1.2 Peru (Auftriebsgebiet, OMZ)

Während der FS Meteor Expedition M77-1 (SFB754) entlang der peruanischen Küste wurden speziell Sauerstoffminimumzonen (OMZ) angesteuert, um dort Grenzschichtaktivitäten und -reaktionen zwischen Sediment und Wasserkörper zu erforschen [Pfannkuche *et al.*, 2010]. Ein besonderes Augenmerk galt dabei der außerordentlichen Dynamik des Systems, basierend auf dem Zusammenspiel von einer OMZ in Kombination mit den hochproduktiven peruanischen Auftriebsgebieten. Hinzu kommt, dass die ost-pazifischen Auftriebsgebiete als eisenlimitiert beschrieben wurden. Der Haupteintrag an Eisen erfolgte durch auf dem Shelf abgelagertes, eisenhaltiges, terrigenes Sediment [Franck *et al.*, 2005]. Die Auswirkung und Reichweite dieses Eintrages wird zur Zeit noch diskutiert, ist dabei als Basis für Primärproduktion, auch im Hinblick auf HNLC-Gebiete von besonderer Bedeutung [DiTullio *et al.*, 2005]. Die an Bord mittels Chemiluminiszenz ausgewertete Proben zeigten zudem einen Fe(II)-Fluss vom Sediment in den Wasserkörper (40 nM). Die Porenwasseranalysen zeigen Konzentrationen von 80 µM Eisen im Shelfbereich, etwa 20 µM in der OMZ auf dem offenen Ozean.

Mit Hilfe von BIGO (biogeochemical observatory) 5 [Sommer *et al.*, 2008] wurde am 15. November 2008 in der Position 11°0.02’ S und 77°47.72’ W in einer Wassertiefe von 85 m die in der vorliegenden Diplomarbeit prozessierte Sedimentprobe entnommen (Station 568). Die Proben wurden an Bord in Horizonte von etwa 5 cm eingeteilt (Kernlänge 16 cm) und in 200 ml Schott Duran Flaschen überführt. Diese wurden mit einem Butylstopfen und Lochkappe verschlossen. Die Lagerung erfolgte bei 4°C.

Das Sediment schien homogen, durch den flüssigen Meerwasserüberstand leicht aufgeschlämmt und durchgängig schwarz, was auf einen reduzierten, eisensulfidreichen Zustand hindeutet. An Bord genommene Porenwasserprofile durch diesen Kern zeigten eine rapide Abnahme von Eisen binnen der ersten 10 cm im Sediment. Der Eisenwert fiel von 80 auf 0 µM. Die Konzentrationen von PO_4^{2-}, NH_4^+ sowie Silikat zeigten einen größerer Stabilität. Phosphat erreichte zwar in einer Sedimenttiefe von 5 cm ein Maximum von 120 µM, war sonst jedoch konstant bei 80 µM. Ammonium nahm in den ersten Zentimetern des Sediments stark zu, 1 zu 1000 µM, stabilisierte sich ab einer Tiefe von 3 cm aber bei etwa 1000 µM. Silikat stieg langsam von 600 auf ca. 800 µM. Eisen und Phosphatflüsse im Sediment, die beide stark sauerstoffabhängig sind, waren hier noch deutlich ausgeprägt [Pfannkuche *et al.*, 2010]. Stickstofffixierung konnte an Bord nicht nachgewiesen werden. Der potentielle terrigene Eintrag von Eisen und Silikat, sowie der hohe Organikanteil könnten mikrobielle Silikatverwitterung in diesen Sedimenten deutlich unterstützen.

2.1.3 Okinawa (CO_2-Seep)

Während der Sonne-Expedition 196 (SUMSUN Projekt) wurde das Yonaguni Knoll IV im Okinawa Trog mit einem *Multicorer (MUC)* beprobt. Die exakte Position der Beprobung war 24°50.819' N und 122°42.041' E in einer Wassertiefe von 1392 m. Die Gesamtlänge des Kerns betrug 37 cm, die vorliegende Sedimentprobe stammte aus 5-10 cm cm Sedimenttiefe. Yonaguni Knoll IV beschreibt dabei eine im südwestlichen Bereich des Okinawa Trogs liegende Gruppe submariner Vulkane, die am 26. Juli 2002 durch das bemannte Tauchboot Shinkai 6500 (Expedition YK00-06 Leg2, Dive 560) entdeckt wurde. Es ist ein aktives hydrothermales Feld, dass sich durch eine Emission von flüssigem CO_2 auszeichnet. Dieses entsteigt dem Sediment zum Einen in Form hydratstabilisierter Blasen, zum Anderen findet es sich in einer Gashydratschicht dicht unter der Sedimentoberfläche [Konno *et al.*, 2006]. Diese Gashydratschicht befindet sich unterhalb von schwefelhaltigen Verbindungen inkl. elementarem Schwefel hydrothermalen Ursprungs. Das CO_2 befindet sich thermodynamisch in einem überkritischen Zustand. In diesem aktiven Feld konnten aufsteigende flüssige CO_2-Blasen dokumentiert werden. Sie entstammten einem der ersten Sedimentschicht unterliegendem Gashydratfeld, dass auf Grund des Dichteunterschieds von einer Schicht flüssigen CO_2 überlagert wurde [Inagaki *et al.*, 2006]. Die Beprobung des analysierten Sediments erfolgte in direkter Nähe des *Abyss Vent l* am 09. März 2008. In dem aktiven, hydrothermal geprägten Feld finden sich zahlreiche schwefelhaltige Präzipitate und amorphe Silikate [Suzuki *et al.*, 2008].

Silikat wurde in Konzentrationen von bis zu 14 mM in den Fluiden des Hydrothermalsystems gemessen, nahm mit steigender Seewasserdurchmischung linear ab [Konno *et al.*, 2006].

Der entnommene Sedimentkern wurde an Bord entsprechend der Horizonte in 200 ml Schott Borosilikatflaschen gefüllt und anaerob mit Butylstopfen und Lochkappe verschlossen. Die Lagerung erfolgt bei 4°C. Das Sediment wirkte homogen und durchgängig grau. Es ist zum einen stark durch das hydrothermale Feld, zum Anderen terrigen beeinflusst. Die Sedimentdicke im südlichen Bereich des Okinawa Trogs wird mit 2 km angegeben [Sibuet *et al.*, 1987]. Der pH-Wert des Porenwassers wird in diesem Habitat deutlich durch die CO_2-Seeps beeinflusst und wurde bereits vorher mit 6,1 angegeben, der theoretische Minimalwert lag bei pH 4 [Inagaki *et al.*, 2006].

2.2 Medien

Um verschiedene mikrobielle Gemeinschaften gezielt zu fördern, wurden die Sedimentproben mit unterschiedlichen Salzwassermedien versetzt. Alle Medien entsprachen einer Salinität von 35. Die Medien für die Sakhalin- und Peru-Sedimente wurden über eine ca. 20%ige CO_2- Atmosphäre auf pH 7,5 eingestellt, die Medien für die Okinawa-Sedimente wurden zusätzlich mit reinst-CO_2 unter ein bar Überdruck gesetzt. Der Rest der Atmosphäre bestand aus N_2 und ist somit sauerstofffrei. Alle Medien wurden anoxisch und reduziert angesetzt. Heterotrophe anaerobe Organismen erhalten ihre Energie über einen Atmungskette und somit eine *proton motive force* (PMF). Diese wird durch den Übertrag von Elektronen aus dem Substrat (Donor) auf von ein Metabolit (Akzeptor) erzeugt. Für die vorliegenden marinen Sedimente kamen mehrere Redoxstufen in Betracht. Folgende vier selektive Medien fanden daher Verwendung:

2.2.1 Salzwassermedium für methanogene Archaeen

Bei dem Methanogenenmedium handelte es sich um ein stark sulfatreduziertes Basismedium. Diese Limitation war notwendig um kompetetive Sulfatreduzierer auszuschließen. Die Grundkomposition ist dabei durch folgende Salze pro Liter Reinstwasser gegeben:

Tab. 2.1: Komposition Basismedium

Salz	MW [g/mol]	Einwaage [g/l]
KBr	119,01	0,09
KCl	74,56	0,6
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	147,02	1,47
$MgCl_2 \cdot 2H_2O$	203,3	5,67
NaCl	58,44	26,37

Über einen $NaHCO_3$-Puffer wurde das Medium auf pH 7,5 eingestellt. Als Sauerstoffindikator diente Resazurin. Resazurin oxidiert bereits bei < 0,1 µM/l Sauerstoff zu Resorufin, was durch einen Farbumschlag von farblos zu rosa deutlich wird. Zusätzlich wurden eine Stickstoff-, sowie eine Phosphatquelle in Form einer entsprechenden 4,67 bzw. 1,47 mM NH_4Cl/ KH_2PO_4-Lösung eingebracht.

2.2.2 Salzwassermedium für Sulfatreduzierer

Zur Förderung der mikrobiellen Sulfatreduktion enthielt das Sulfatreduzierermedium 27,6 mM Magnesiumsulfat. Im Gegensatz zu dem methanogenen Basismedium [Tabelle 2.1] sank der Magnesiumchloridanteil auf 5,67 g/l, dafür wurden 6,8 g/l Magnesiumsulfathexahydrat eingesetzt.

2.2.3 Salzwassermedium für Eisenreduzierer

Da bereits gezeigt werden konnte, dass Eisenreduzierer P-Verbindungen aus Eisenoxiden lösen können [Jansson, 1987], könnten eisenreduzierend Mikroorganismen auch einen Einfluss auf die Struktur von Silikaten nehmen. Um diesen Ansatz experimentell weiter verfolgen zu können, wurde für die Inkubationsexperimente ein Eisenreduzierermedium nach Vorgaben von Lovley [Falkow, 2006] angesetzt. Der Hauptunterschied zu den anderen Medien war der geringere pH-Wert (6,5). Dem Medium wurde keine weitere Eisenspezies zugesetzt, damit im Sediment bzw. Silikat enthaltene Eisenquellen genutzt werden könnten.

2.2.4 Salzwassermedium für Fermentierer

Basierend auf dem Sulfatreduzierermedium wurde dem Fermentierermedium leicht zu fermentierendes Substrat hinzugefügt. Dabei handelte es sich um Stärke (1 g/l), Hefeextrakt (1 g/l) und Glukose (3 mM). Um thermische Zersetzung der Substrate während des Autoklaviervorgangs zu vermeiden, wurde das Substrat erst nach Einstellung des Mediums anaerob in der Anaerobenbox

in das Medium injiziert.

2.3 Versuchsaufbau

Die komplette Versuchsanordnung basierte auf zwei sich ergänzenden Analysen. Auf der einen Seite stand die Inkubation von Sedimenten mit ausgewählten silikathaltigen Mineralien in spezifischen Medien mit anschließender Metaboliten- und Ionenanalyse, auf der anderen Seite ein mikrobieller Identifikations- und Seqeunzierungsansatz zur Darstellung der mikrobiellen Diversität. Vervollständigt wurde der experimentelle Teil durch zwei bildgebende Verfahren, die Veränderungen an den inkubierten Mineralien, sowie potentiellen mikrobiellen Bewuchs sichtbar machen sollten. Hierbei wurde zum Einen Rasterelektronenmikroskopie (REM), zum Anderen oligonukleotidbasierende *Catalyzed-Reporter-Deposition-Fluorescence-In-Situ-Hybridization* (CARD-FISH) eingesetzt.

Die Grundidee des Inkubationsversuche bestand darin, Sedimente aus den unterschiedlichen Habitaten mit künstlichem Meerwasser definierter Komposition zu versetzten und diese sog. *Slurries* mit Silikaten zu inokulieren. Über den sich anschließenden Inkubationszeitraum sollten sowohl Veränderungen in der chemischen Komposition der *Slurries*, als auch der überstehenden Gasphase gemessen und ausgewertet. Hierfür war es notwendig geschlossene Inkubationssysteme zu schaffen, die ohne Kontakt zur Umgebung beprobbar waren. Um die Mikrokosmen möglichst nahe der *in situ*-Parameter zu inkubieren wurden sie bei 4°C in Dunkelheit gelagert. Nicht simulierbarer Parameter war hierbei der hydrostatische Druck. Bis auf die Proben aus Okinawa begannen alle Proben ihre Inkubation bei Normaldruck.

Für jedes der drei untersuchten Habitate sollten vier spezielle Medien unterschiedliche bakterielle Gemeinschaften fördern. So war es möglich in diesen parallelen Ansätzen erste Aussagen über Bioaktivität und Silikatumsatz machen zu können. Für alle Sedimente wurde sowohl eine silikatfreie Inkubation (Medium und Sediment), als auch eine sedimentfreie Inkubation (Medium und Silikat) als Kontrolle etabliert um mögliche chemische Nebenreaktionen oder Interaktionen mit den Experimentalwerkzeugen detektieren zu können.

In der molekularen Analyse wurden zunächst aus Unterproben der Sedimente DNA-Proben aufgereinigt und sequenziert. Nach Abschluss der Inkubationsphasen wurden die o.g. Mikrokosmen geöffnet und die inokulierten Silikate entnommen. Unter der Annahme, dass für Silikatverwitte-

rung ein direkter Zell-Mineral-Kontakt notwendig sei, wurden die Silikate mittels eines speziellen CARD-FISH-Protokolls für Mineralienoberflächen untersucht. Die daraus resultierenden Fluoreszenzbilder sollten Aufschluss über die Zusammensetzung der potentiellen mikrobiellen Gemeinschaft auf den Silikaten geben.

2.4 Kernbeprobung

Die Beprobung der Sedimentkerne folgte den Lagerungsbedingungen der Kerne. Die Sakhalinproben wurden dem Gesamtkern aerob und steril entnommen. Bereits anaerob gelagerte Kerne (Peru und Okinawa) wurden ausschließlich in der Anaerobenbox beprobt. Alle Materialien die während der Beprobung benutzt wurden, wurden entsprechend der Möglichkeiten vorher entweder autoklaviert oder mit 70%igem EtOH behandelt. Des Weiteren wurden Nitrilhandschuhe und Schutzkleidung verwendet um Kontamination zu vermeiden. Eine entsprechende Beprobung an Bord kann nicht sichergestellt werden. Pro Sediment wurden etwa 120 ml entnommen und bei 4°C prozessiert. Die Einbindung der Proben aus dem Okinawa Trog erfolgte erst nach Erprobung der Mikrokosmen.

2.5 Schematischer Versuchsaufbau

Der allgemeine Versuchsaufbau, besonders die Aufteilung der Sedimente auf die Medien wird in [Abb. 2.1] exemplarisch beschrieben. Dabei sind grundsätzlich zwei Phasen zu unterscheiden:

2.5.1 Equilibrierungsphase

Ziel dieser Phase war es die Sedimente samt Mikroorganismen mit dem neuen Medium zu equilibrieren, einen Ionen und pH-Ausgleich zu ermöglichen und somit einen homogenen Stamm*slurry* zu schaffen. Gerade im Bezug auf das aus dem Sakhalin Trog stammendem Sediment war ungewiss, ob sich auf Grund der Lagerung überhaupt noch vitale Mikroorganismen in dem Sediment befinden würden. Die Equilibrierungsphase sollte in diesem Fall zusätzlich der Revitalisierung dienen und ggf. den Übergang von Dauerstadien in aktive Mikroorganismen unterstützen. Alle Arbeiten wurden in der Anaerobenbox durchgeführt. Dafür wurden pro Sediment ein Volumen von viermal 25 ml mit einer abgeschnittenen sterilen Spritze entnommen und auf vier Ansätze verteilt. Jeder dieser Ansätze wurde dann mit 25 ml eines der vier Medien aufgefüllt. Da es Lieferzeitverzögerung für die eigentlichen Inkubationsgefäße gab wurden die ersten Ansätze in

N_2-begaste PE-Beutel verpackt und dann in je einer 200 ml Schott Duran Flasche anaerob bei 4°C in Dunkelheit gelagert. Dieser Ansatz wurde nach 14 Tagen in das eigentlich System anaerob unter Sauerstoffausschluss überführt.

SeptaJars

Für die Anzucht der Mikroben wurden spezielle Probengefäße, sog. SeptaJars [Orcutt *et al.*, 2004] verwendet. Dabei handelte es sich um Glasgefäße die mit einem Kunststoffdeckel verschlossen werden. In der Mitte des Deckels befand sich ein Teflon/ Gummi Septum, dass eine Beprobung des Inhalts ermöglichte. Um Kontaminationen, insbesondere den Eintrag von Silikaten ausschliessen zu können, wurden die Gefäße mit einem Einsatz versehen. Dazu wurden silikatfreie Probendosen auf die entsprechende Größe geschnitten und in das Probengefäß gestellt. Der Einsatz verhinderte somit den Sediment-Glas-Kontakt, während das Glas die Gasdichtigkeit des Systems gewährleistet. Über das Septum konnte dann mit einer sterilen Kanüle, samt begaster Spritze, die Beprobung erfolgen.

Problematik

Nach etwa einem Monat Beprobung zeigte sich keine zu erwartende Akkumulation von Methan oder Sulfid. Einige Tests an den Inkubationsgefäßen ergaben, dass diese mit der Zeit Undichtigkeiten aufwiesen, die potentielle Gradienten oder Akkumulationen von Metaboliten nihilierten. So konnte ein deutlicher Einstrom von Sauerstoff in vorher anaerob begaste Inkubationsgefäße gemessen werden. Nach 72 h entsprach die Gasphase in den Inkubationsgefäße der der umgebenden Atmosphäre. Verschiedene Möglichkeiten der Abdichtung wurden im Folgenden getestet (Teflonband, Schlifffett, Silikone), ohne jedoch eine dauerhafte Verbesserung oder stabile Abdichtung zu erzielen.

Borosilikatflaschen

Um einen Einstrom von für z.B. methanogene Bakterien toxischen Gasen wie O_2 auszuschließen, wurden die Inkubationen auf 100 ml Borosilikatflaschen mit Lochkappe und Butylstopfen umgesetzt. Zur Detektion einer potentiellen Kontamination mit Silikat durch den direkten Kontakt mit dem Glas wurden parallele Mediumkontrollen etabliert und in den Messzyklus integriert.

2.5.2 Inkubationsphase

Die *Slurries* wurden nach der Equilibrierungsphase anaerob aufgeteilt. Von den 50 ml wurden zweimal 15 ml entnommen und erneut mit je 15 ml Medium aufgefüllt. Von diesen Ansätzen wurde einer mit Bytownit (B), der andere mit Orthoklas (O) inokuliert. Der verbleibende Stamm*slurry* von 20 ml wurde als Kontrolle (X) mit der gleichen Menge Medium versetzt. Die Aufteilung wird in [Abb. 2.1] exemplarisch dargestellt. Überwacht wurden diese Proben durch zwei Kontrollsätze. Diese wurden ebenso beprobt und gelagert, Sediment wurde jedoch durch Medium ersetzt. Es wurden zwei parallele Kontrollansätze notwendig, da sich die Medien für Proben aus Okinawa dur einen geringeren pH-Wert von den anderen Mediuen unterschieden. Insgesamt ergaben sich so 72 Mikrokosmen.

2.5.3 Silikate

Zur Inkubation wurden Bytownit und Orthoklas mechanisch auf 0,2 bis 0,5 mm durchmessende Kristalle gebrochen. Beide Silikate treten marin auf und wurden u.a. in geologischen Analysen beschrieben.

Bytownit

Hierbei handelte es sich um ein triklines Mineral mit der allgemeinen Summenformel

$$(\mathrm{Ca, Na})[(\mathrm{Al, Si})2\mathrm{Si_2O_8}] \tag{2.1}$$

Bytownit erscheint im Gesamtkristall weißlich-grau. In vorherigen Studien konnte gezeigt werden, dass Bytownit für mikrobielle Verwitterung suszeptible ist [Vandevivere *et al.*, 1994].

Orthoklas

Dieser monokline Feldspart, der ebenfalls zur Klasse der Silikate zählt hat die allgemeine Summenformel:

$$\mathrm{K[AlSi_3O_8]} \tag{2.2}$$

Es konnte bereits gezeigt werden, dass Silikate mit hohem Al(III)-Anteil bis zu 25% höhere Verwitterungsraten aufweisen [Emerson and Hedges, 2008]. In Anlehnung an [Gleichung 1.3] ergibt sich dann

$$2\,\mathrm{KAlSiO} + 6\mathrm{H_2O} + 2\mathrm{CO_2} \longrightarrow \mathrm{Al_2Si_4O_{10}(OH)_2} + 2\mathrm{HCO_3^-} + 2\,\mathrm{K^+} \tag{2.3}$$

Der Feldspart würde somit zu zu einem Schichtsilikat (Montmorillonit) umgewandelt [Mortatti and Probst, 2003]. Das freiwerdende Hydrogencarbonat könnte dann in der wässerigen Umgebung

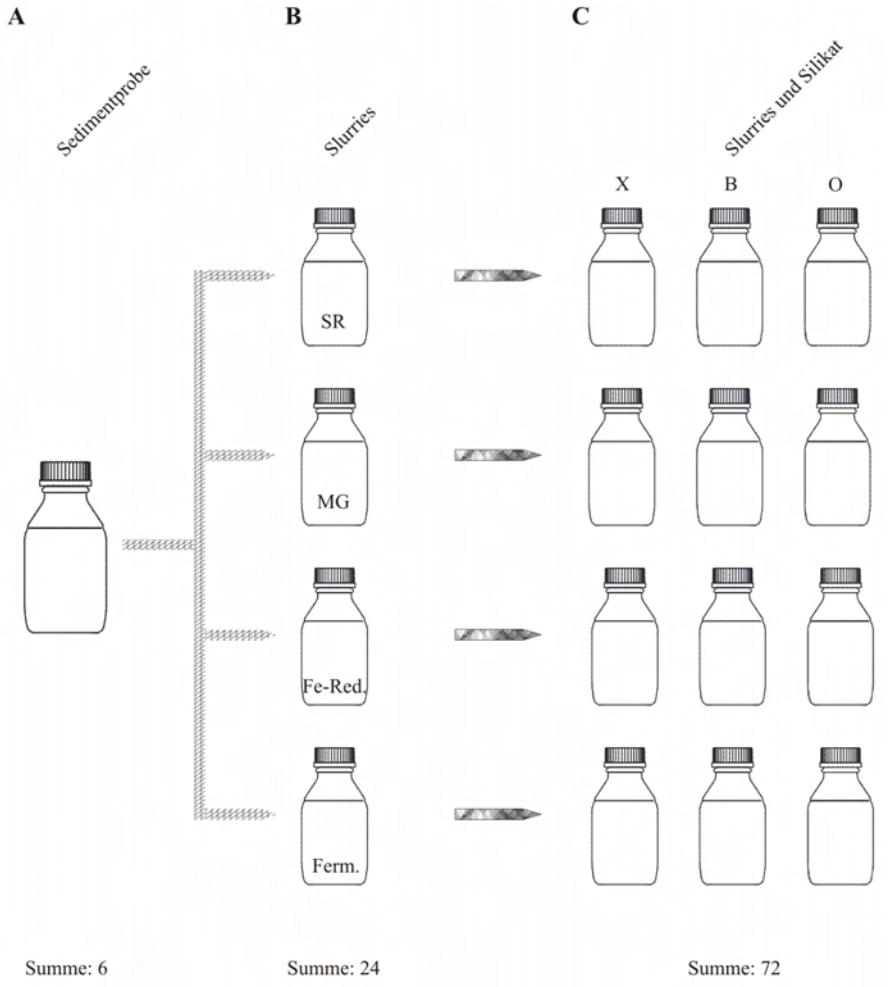

Abb. 2.1: Schematischer Aufbau der Sediment- und Silikatinkubation, dargestellt an einem Beispiel. Die Anzahl der Flaschen pro Stufe ist unter den Spalten angegebenen. **A** Insgesamt existierten vier Habitate, namentlich Sakhalin SR, Sakhalin Met, Peru und Okinawa, sowie zwei sedimentfreie Medienkontrollen, je ein Satz für Okinawa sowie ein Satz für die drei anderen Habitate **B** Jedes Sediment wurde mit vier verschiedenen Medien zu einem sog. *Slurry* aufgeschlämmt. Als Medium waren je ein Sulfatreduzierer- (SR), Metahnogenen- (MG), Eisenreduzierer- (Fe) sowie Fermentierermedium (Ferm) im System. **C** Jeder *Slurry* wurde auf drei Ansätze verteilt. Der erste Ansatz blieb unbehandelt (X), der Zweite wurde mit Bytownit inokuliert (B), der Letzte mit Orthoklas (O). Insgesamt ergaben sich so 72 Ansätze.

mit Ca^{2+} als Kalziumcarbonat präzipitieren.

2.6 Düngung

Um das Wachstum einiger metabolisch langsamer Mikroorganismen zu stimulieren wurden universelle Substrate in die Kulturansätze injiziert. Entsprechend positiven Effekten in artverwandtem Sediment [Nauhaus *et al.*, 2002] wurden in die Inkubationsansätze einmalig 1 bar H_2, sowie 15 mM Natriumacetat (NaAc) steril appliziert. Ausgenommen hiervon waren alle Proben in Fermentierermedium, da bei diesen Ethansäure als potentielle metabolisches Produkt auftritt.

3 Messverfahren und nicht-molekulare Bildgebung

Die metabolischen Raten und stofflichen Umsätze innerhalb der Mikrokosem wurden während der Equilibrierungsphase und der Inkubationsphase anhand einiger Schlüsselwerte verfolgt. Für alle Probennahmen gilt, dass der Eingriff in das System so gering wie möglich und die Entnahmen steril sein mussten. Alle verwendeten Geräte, wie z.B. Kanülen waren steril, alle luftgefüllten Räume z.B. innerhalb von Spritzen vorher mit N_2 oder N_2/ CO_2 gespült worden. Ersetzte Volumina wurden entsprechend ihrer Verdünnung in der Auswertung berücksichtigt.

3.1 Messungen periodisch

Um die Entwicklung der Inkubationen verfolgen zu können, wurden regelmäßig folgende Messungen vorgenommen:

3.1.1 Sulfid

Sulfat ist der dominante Elektronenakzeptor in anaeroben Sedimenten [Jørgensen, 1982]. Sulfatreduzierer übertreffen hier Methanogene in der Konkurrenz um gemeinsame Substrate. Sie können an einer Vielzahl metabolischer Prozesse mitwirken, ein Produkt der metabolischen Umsätze ist dabei Sulfid. Sulfid kann photometrisch nach Cord-Ruwisch bestimmt werden [Cord-Ruwisch, 1985]. Dabei handelte es sich um einen Nachweis über eine $CuSO_4$-Lösung, die je nach Sulfidkonzentration einen leicht bläulichen bis tief braunen Farbkomplex erzeugte. Die Absorption konnte bei 480 nm gemessen und über eine zuvor angefertigte Standardreihe ausgewertet werden.

3.1.2 CH_4

Methanogene Prozesse sollten hier als ein möglicher Proxy für mikrobielle Aktivität dienen. Die Gasphase der mit Methanogenenmedium inkubierten Proben wurden daher in regelmäßigem Abstand anaerob beprobt und im GC gemessen. Die Messung erfolgt an einem HP 5890 Series II Gaschromatographen mit Flammenionisationsdetektor (FID). Der Gerätestandard wurde regelmäßig vor einer Messreihe mit einer 2-Punkt-Kalibrierung überprüft. Zu diesem Zweck wurden zunächst 100 µl eines 100 ppm Methanstandards und anschließend das gleiche Volumen eines 1000 ppm Methanstandards injiziert und gemessen. Die integrierten Flächen der Signale sollten proportional zueinander sein. Für die Messung wurden 100 µl der Proben mit einer N_2-begasten

Glasspritze durch den Butylstopfen aus der Gasphase der Mikrokosem entnommen und durch ein Teflonseptum in den GC injiziert. Das Analysegas wurde dann via inertem Trägergas (He) bei einer Ofentemperatur von 50°C über die gepackte Säule auf den FID mit einer Detektortemperatur von 180°C geleitet. Entsprechend den Flusseinstellungen war der Methanpeak bei 1,4 Minuten zu erwarten. Über das zugehörige EDV-gestützte HP Chem Station Programm wurden alle, in zwei Minuten, auftretenden Peaks automatisch integriert. Die so gewonnenen Flächen konnten über die zu Beginn ermittelten Standardreihen in ppm umgerechnet werden. Die entnommenen Volumina wurden nur während der Equilibrierungsphase mit N_2/ CO_2 aufgefüllt. Dabei wurde deutlich, dass die Kontaminationsgefahr bei einem erneuten Auftoppen im 100 µl-Maßstab wesentlich größer war, als der zu erwartende Nutzen. Demzufolge wurde bei den Ansätzen in Borosilikatflaschen von dieser Praxis abgesehen.

3.1.3 Eisen

In den mit Eisenreduzierermedium inkubierten Sedimenten wurden die Konzentrationen von Fe(II) und Fe(III) gemessen. Fe(II) hat gegenüber Fe(III) eine höhere Löslichkeit. Fe(III) kann als Elektronendonor für mikrobielle Atmungsprozesse dienen. Die hier angewandte Messmethode ermöglichte keinen direkten Vergleich mit den Medienkontrollen, da diese über keine Sedimenteinwaage verfügten. Um die vorliegenden Messwerte trotzdem bewerten zu können, wurde für die Medienkontrollen die Eisenkonzentrationen in [µM] des Mediums ohne Trockengewicht-Einfluss bestimmt. Neben der klassischen Berechnung hat sich eine Formel [Gleichung 3.1] bewährt, die eine Aussage über die Eisenkonzentration in µM zulässt:

$$\text{Extinktion}_{562nm} * \frac{2,03\frac{mg}{l}}{55,845\frac{g}{mol}} \tag{3.1}$$

Wobei 2,03 ein empirischer Faktor ist und 55,845 das Molekulargewicht von Eisen in [g/mol]. Eisen(II) und Eisen(III) wurden photometrisch über eine Ferrospectrallösung nachgewiesen [Stookey, 1970]. Hierfür wurden zwei Lösungen vorbereitet. Die Erste enthielt 11,915 g/l HEPES und 1 g/l Ferrospectral. Sie diente dem Nachweis von Fe(II). Um Fe(III) nachweisen zu können; wurde einer zweiten Lösung 1 g/l Hydroxylammoniumchlorid als Reduktionsmittel zugesetzt. Höher oxidierte Eisenspezies wurden so zu Fe(II) reduziert und konnten ebenfalls über die Ferrospectralreaktion nachgewiesen werden. Um diese Reaktion zu quantifizieren wurde 0,1 ml der Slurrieprobe für eine Stunde in 5 ml 1 M HCl geschüttelt (120 min^{-1}) um Eisenspezies aus dem Sediment zu lösen. Anschließend wurde das Sediment abzentrifugiert und für die Trockenmasse-

bestimmung aufgehoben. 100 µl des klaren Überstands wurden 20 Minuten in 5 ml der Reagenz inkubiert und dann bei 562 nm photometrisch vermessen. Das abzentrifugierte Sediment wurde bis zur Gewichtskonstanz getrocknet und dann gewogen. Durch den Abgleich mit einer Standardreihe konnte unter Berücksichtigung des Trockengewichts die Fe-Konzentration errechnet werden.

3.1.4 CO_2

Dem Salzwassermedium für Fermentierer wurden leicht metabolisierbare Kohlenstoffverbindungen, wie z.B. Glukose und Stärke zugesetzt, die bei Anwesenheit von Fermentierern in den Sedimentproben zu einen Anstieg von CO_2 führen sollten. Die Proben aus dem Sakhalin Trog und der peruanischen OMZ wurden zu Beginn der Inkubationsphase unter einer 20% CO_2/ 80% N_2-Atmosphäre angesetzt. Um den Habitateigenschaften Rechnung zu tragen, wurden die Proben aus dem Okinawa Trog zusätzlich mit reinem CO_2 in 1 bar Überdruck angesetzt. Diese Behandlung hat außerdem den Vorteil, dass Proben aus der Gasphase direkt in den Gaschromatographen injiziert werden konnten. Bei niedrigeren Konzentrationen hätten die Proben vorher mit einer definierten Menge CO_2 versetzt werden müssen, um den Kalibrationsbereich des GCs zu erreichen. Die Messung erfolgt an einem GC mit Wärmeleitfähigkeitsdetektor. Bei der Beprobung wurde die Säule zuerst mit 15 ml He gespült. Anschließend wurden 2,5 ml der Gasphase der Proben steril durch den Butylstopfen entnommen und in den GC injiziert. Ein Messvorgang dauerte 15 Minuten und gab so die Möglichkeit auch weitere Gase, die ggf. als Verunreinigung oder nicht erwartete Nebenprodukte auftreten könnten, zu detektieren. Da die Proben anaerob gehalten werden sollten, wurde seit der Dichtigkeitsproblematik während der Equilibrierungsphase neben dem Zielmetabolit CO_2 auch N_2 und, falls auftretend, O_2 gemessen. Nach Messung der Probe wurde das entnommene Volumen mit Helium aufgefüllt. Die gewonnenen Daten wurden EDV-gestützt integriert und über eine Kalibrierung in ppm umgerechnet. Alle Werte wurden entsprechend der bei der Messung entstandenen Verdünnung korrigiert.

3.2 Messungen, aperiodisch

Die im Folgenden dargestellten Analysen erfolgen nicht wöchentlich, sondern angepasst über den Inkubationszeitraum verteilt. Alle Entnahmen erfolgten entsprechend der o.g. Vorgaben. Wenn die Proben nicht sofort gemessen wurden, erfolgte eine Lagerung bei -20°C.

3.2.1 Silikat

Silikat kann in saurem Milieu über eine Komplexierung mit Molybdatverbindungen nachgewiesen werden. Da das Heptamolybdat bei saurem pH-Wert kondensiert und in einem alkalischeren pH-Bereich dekondensieren würde, lag pH-Wert lag bei ca. 2. Der Nachweis des blauen Farbkomplexes erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von 810 nm. Über eine Standardreihe konnten die Absorptionswerte auf Konzentrationen umgerechnet werden. Da die Mikrokosmen in Borosilikatflaschen angesetzt wurden, konnte ein Fremdeintrag von Silikat durch die Glasgefäße nicht vollständig ausgeschlossen werden. Um diesen Faktor quantifizierbar zu machen wurden sedimentfreie Medienkontrollen angesetzt. Für die Okinawaproben wurden eigenen Kontrolle angesetzt, da die hierbei verwendeten Medien auf einen geringeren pH-Wert eingestellt waren. Ein geringerer pH-Wert könnte zu einer verstärkten Freisetzung von Si-Ionen aus dem Glas führen. Messungen ergaben für die Okinawamedien einen pH-Wert von 5,8 für das Sulfatreduzierer- und pH 6 für die drei anderen Medien.

3.2.2 Organische Säuren

Ein Volumen von 1,3 ml des klaren Mediumüberstands wurden entnommen und in ausgeglühten (12 h, 520°C) Braunglasvials mit Septum gegeben. Die Analyse erfolgt per Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) am MPI Bremen. Die dortige HPLC-Anlage maß parallel mit zwei Detektoren. Der UV/Vis-Detektor war auf eine Wellenlänge von 210 nm eingestellt. Bei dem zweiten Detektor handelte es sich um einen RI-Detektor. Letzterer war wesentlich ungenauer, konnte aber über einen weiteren Messbereich eingesetzt werden, solange er ideal temperiert war. Die nominale Ausschlussgrenze für den RI-Detektor lag bei Konzentrationen unter 4-6 mM. Als Trägergas fungiert Helium.

3.2.3 Schlüsselelemente

Um eine Vergleichbarkeit und Einordnung der vier Sedimentproben treffen zu können, wurden folgende sechs relevante Schlüsselelemente bestimmt: Aluminium, Eisen, Mangan, Kalzium, Kalium und Magnesium. Diese wurden per Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-MS) bzw. optischer ICP-Emissionsspektrometrie (ICP-OES) bestimmt.
Bei der ICP-MS wurde die flüssige Probe, die über eine Schlauchpumpe aus dem ALS Autosampler zugeführt wurde, zuerst zerstäubt und dann in ein bis zu 7500°C heißes Argon-Plasma mit einer Leistung von ca. 1,6 kW und einer Frequenz von 27,12 MHz injiziert. Das feine Aerosol wurde

dabei binnen 10 ms zuerst verdampft, dann atomisiert und schließlich ionisiert. Über eine Vielzahl von Teilchenlinsen und unter Abscheidung der Photonen wurde der Teilchenstrom schließlich in ein Quadrupol geleitet, dem ein Detektor nachgeschaltet war. Hier erfolgt eine Messung als Einschläge pro Zeiteinheit. Die Auftrennung erfolgte klassisch nach dem Verhältnis von Masse zu Ladungszahl (m/z). Nach einem ersten Testversuch wurden Al, Fe und Mn an der ICP-MS gemessen, für Ca, K, und Mg fand alternativ die Messung an der ICP-OES Anwendung.

3.2.3.1 Probenvorbereitung

Für die Analyse wurden den Mikrokosmen ca. 3 ml klarer Überstand mit einer gasgespülten Einmalspritze entnommen und in einem säuregespülten Zinser-Vial mit 10 µl HNO_3 pro ml Probe versetzt. Diese Probe wurde bis zur Analyse bei -20 °C eingefroren.

3.2.3.2 Standardreihe

Alle Reaktionsschritte wurden in Teflongefäßen und mit glasfreien Hilfsmitteln durchgeführt. Gefäße wurden in 2%iger HNO_3 gelagert und vor Benutzung dreimal gründlich mit Reinstwasser gespült. Auch die Probenvials für die ICP-MS waren aus Teflon. Zur Kalibrierung der ICP-MS wurde eine gemischter Standard für alle drei Elemente angesetzt. Dieser basiert auf je einem 10000 ppm Standard für Al und Fe, sowie einem 1000 ppm Standard für Mn (Spex CentriPrep). In einem 100-ml-Maßkolben wurde etwas Reinstwasser vorgelegt und für die 10 ppm-Stammlösung je 100 µl der beide 10000er Standards und 1000 µl des 1000er Standards zugegeben. Hinzu kamen 3 ml HNO_3 mit einer finalen Konzentration von 2%, sowie 5 ml einer 2,4 µM Natriumchloridlösung. Das Volumen wurde auf 100 ml mit Reinstwasser aufgefüllt. Für die Standardreihe wurde die Stocklösung mit Reinstwasser auf 0; 1; 2,5; 5; 10; 50 und 500 ppb verdünnt. Um diese in der ICP-MS zu messen wurde jede Probe 1:10 mit einer 1% Y/ 1% Sc/ 1% In in 2%HNO_3 Lösung verdünnt. Die Standards wurden mit einer 1%igen Y/Sc Lösung als internem Standard abgeglichen. Beide Elemente sind in regulären Umweltproben relativ selten und ermöglichen so eine Vergleichbarkeit der Proben und gleichzeitig den Nachweis von Drift. Befindet sich auch Yttrium und Scandium in den Proben kann auf Indium als Zusatz ausgewichen werden. Zusätzlich lief ein IAPSO-Seewasserstandard mit (Batch P150 22.05.2008, K_{15}=0,99978, S=34,991). Letzterer ermöglichte eine Korrektur der Messwerte entsprechend einer Drift in den Konzentrationen.

3.2.3.3 Proben

Die für die ICP-MS-Analyse gewonnenen Proben wurden aufgetaut, durch einen 0,2 µm Spritzenvorsatzfilter sterilfiltriert und mit der o.g. Y/Sc/In-Lösung 1:10 verdünnt.

3.2.3.4 Messung

Die Probe wurden über den Autosampler dem Teflonzerstäuber zugeführt. Nach jeder Probe wurde das Zuleitungssystem automatisch mit Reinstwasser und 2%iger HNO_3 gespült. Die Messergebnisse konnten über die zuvor ermittelten Standardreihen abgeglichen und in Konzentrationen umgerechnet werden. Standards und IAPSO wurden immer wieder in die Messroutinen integriert. Somit war eine Drift der Werte über den Messzeitraum quantifizierbar. Störungen durch falschpositive Signale im Bereich gleicher m/z-Verhältnisse von Oxiden und Probe, wurden als Rate gemessen und bei der Feineinstellung des Geräts berücksichtigt.

3.2.3.5 Mathematische Korrektur

Die Startwerte konnten als absolut angesehen werden. Für die Endwerte ergab sich eine notwendige Korrektur, da nach jeder Messung das entnommene Volumen mit frischem Medium aufgefüllt wurde.

Gemäß:

$$\Delta c = c_{\text{Ende}} - c_{\text{Start}} \frac{V_{\text{Start}}}{V_{\text{Start}} + V_{\text{Medium}}} - c_{\text{Medium}} \frac{V_{\text{Medium}}}{V_{\text{Start}} + V_{\text{Medium}}} \tag{3.2}$$

mit

Δ c	Konzentrationsänderung
c_{Start}	Konzentration zum Startzeitpunkt
c_{Ende}	Konzentration zum Endzeitpunkt
c_{Medium}	Konzentration in frischem Medium
$V_{\text{S,E,M}}$	entsprechend für Volumen

wurden die Ergebnisse Konzentrationsänderungen bestimmt. Zusätzlich wurden die Werte über die entsprechenden Medienkontrollen korrigiert.

3.3 Rasterelektronenmikroskopie

Bei dem Abschluss der Inkubationsphase ergab sich für das Okinawasediment eine Gesamtinkubationszeit von 52 Tagen, für alle anderen Sedimente und die dazugehörigen Kontrollen eine Gesamtdauer von 71 Tagen. Nach Abschluss der Inkubationszeit folgten, neben dem Messen des

nun vollständigen Probensatzes, wesentliche analytische und bildgebende Verfahren zur finalen Beurteilung der Silikatverwitterung und Funktionalität des hier eingeführten Systems.

Probenvorbereitung

In diesem Versuchsteil sollte untersucht werden, ob die inokulierten Silikate im Vergleich zu den Medienkontrollen nach der Inkubation Veränderungen der Oberflächenstruktur aufwiesen. Zusätzlich könnte die Darstellung von Organismen auf dem Kristall einen ersten Anhaltspunkt für die CARD-FISH Analysen liefern. Für die Fixierung der Probe wurden zwei verschiedene Protokolle angewendet. Während Spuren der Silikatverwitterung durch ein Entfernen des potentiellen Biofilms mit Ethanol sichtbar gemacht werden sollten, sollte der eigentliche Biofilm durch die Fixierung mit Karnovskyreagenz fixiert.

Ethanolbehandlung

Die Silikate wurden mittels Spatel oder Pinzette aus dem System entnommen, während der Mirkokosmos per Hungatenadel begast wurde. In einem 70%igem Ethanolbad wurden unter leichtem Schwenken Sedimentreste von den Silikaten entfernt. Nach einer Stunde wurde das EtOH mit einer Pipette entfernt und erneuert. Nach einer weiteren Stunde wurden die Silikate über eine aufsteigende EtOH-Trocknungsreihe getrocknet und in einem Exzikkator bis zur Goldbeschichtung gelagert.

Fixierung nach Karnovsky

Die Proben wurden wie bei der EtOH-Behandlung entnommen und in ein Bad mit Karnovskyreagenz zur Fixierung überführt. Um der schwierigen Topographie und Mikrooberflächen der Kristalle Rechnung zu tragen, wurden sie dort für 3,75 Stunden belassen. Es folgten fünf Waschschritte in Reinstwasser für je sieben Minuten. Eine zweite Fixierung mit Osmiumtetroxid (OsO_4) für 20 Minuten folgte und wurde durch drei Waschschritte, erneut mit Reinstwasser für je 15 Minuten, abgeschlossen. Zur Dehydration wurde ebenfalls eine dreistufige EtOH-Trocknungsreihe verwendet. Auch diese Proben wurden in einem Exzikkator verwahrt.

Stubs und Goldbeschichtung

Mittels eines Spezialklebers wurden die Kristalle auf Aluminiumprobenträger (sog. Stubs) geklebt und anschließend in einem BAL-TEC SCD 050 Sputter Coater im ersten Anlauf für 300 s mit Gold besputtert. Dieses Verfahren war notwendig um Aufladungseffekten durch den Elektronenstrahl vorzubeugen. Da Silikate allgemein elektrisch isolierend wirken, wurde eine dünne

Goldschicht aufgebracht.

Mikroskopie

Die so vorbehandelten Proben wurden in einem DSM 940 von Zeiss mikroskopiert. Dazu konnten immer vier Stubs auf einem Probenteller in die Vakuumkammer des Mikroskops eingebracht und von außen mittels Manipulatoren mechanisch ausgerichtet werden. Die Bildanalyse erfolgte EDV-gestützt über die Software Orion 6.60.4 der belgischen Firma Ë.L.I sprl.

4 Molekulare Analysen und Bildgebung

Im folgenden Abschnitt finden sich die Analysen für drei untersuchte Sedimente. Dazu zählen die Sedimente Sakahlin Trog aus dem Sulfatreduziererzone (S SR), Sakhalin Trog methanogene Zone (S MG) sowie Peru (Peru). Bei der phylogenetischen Analyse wurden die Proben aus dem Okinawa Trog ausgeschlossen, da diese bereits untersucht waren [Inagaki *et al.*, 2006; Nunoura *et al.*, 2010].

4.1 rDNA-Analyse

Ribosomale DNA (rDNA) kodiert ribosomale rRNA die funktionell und strukturell am Aufbau von Ribosomen beteiligt sind. Grundsätzlich sind rRNAs mit unterschiedlichem Sedimentationskoeffizienten nach Svedberg (S) bezeichnet. Für die phylogenetischen Analysen zur Identifikation von Organismen aus Umweltproben wird ausgenutzt, dass diese Sequenzen hochkonserviert sind [Coenye and Vandamme, 2003]. Auf Grund des Informationsgehalts der 16S rDNA (Prokaryoten) und 18S rDNA (Eukaryoten) lassen sich im Abgleich mit Datenbanken phylogenetische Zuordnungen treffen. 16S rDNA dient als spezifischer Marker für prokaryotische Organismen. Durch die Analyse sollte ein Einblick in die Komplexität der mikrobiellen Gemeinschaft in den Probensedimenten geschaffen werden. Um den Einfluss von eukaryotischen Organismen ausschließen zu können, wurde zusätzlich eine 18S rDNA-Analyse durchgeführt. Die Vorgehensweise der beiden Analysen war technisch identisch.

4.1.1 Isolierung von ribosomaler DNA

Für die Islolierung der rDNA wurden unterschiedliche Methoden und kommerzielle Kits getestet. Unabhängig von dem verwendeten Protokoll wurden für die Isolierung aus den Zielsedimenten je zweimal 0,25 g Sediment eingesetzt.

soilDNA Kit (Omega Bio-Tek)

Bei dem *soilDNA Kit* handelte es sich um ein kommerzielles Kit der Firma Omega Bio-Tek. Die Isolierung erfolgte nach Angaben des Herstellers. Die Proben wurden im *Genome Grinder* zweimal 180 Sekunden mit 1200 Schlägen pro Minute mechanisch aufgeschlossen. Bei einer anschließenden Inkubation bei 70°C wurden die Proteine denaturiert und im Anschluss abzentrifugiert.

Die Fällung der DNA erfolgte mit Isopropanol. Nach kurzer Inkubation konnte die DNA pelletiert werden.

FastDNA Spin Kit for soil (MP)

Bei diesem kommerziellen Kit der Firma MP erfolgte die Isolierung ebenfalls nach Angaben des Herstellers. Die Proben wurden auch im *Genome Grinder* aufgeschlossen und die Proteine gefällt. In diesem Fall wurde die DNA erst an eine silikatbasierenden DNA-Bindematrix und an in einer Säule gebunden. Um Ethanolreste der Waschlösung vollständig zu entfernen wurde die Säule mit der gebundenen DNA für fünf Minuten bei 55°C im Heizblock inkubiert. Die Elution von der Säule erfolgte mit 50-100 µl DNase/ pyrogenfreies Wasser (DES). Die DNA wurde bei -20°C gelagert.

Direkte Lyse

Bei diesem Protokoll handelt es sich um ein modifiziertes Isolierungsprotokoll für chromosomale DNA aus Gewässerproben nach [Henne *et al.*, 1999]. Der Wirkmechanismus lag hier bei einer Kombination aus chemikalischer und enzymatischer Reaktion, die durch einen wie bereits oben beschriebenen *Genome Grinder*-Aufschluss unterstützt werden konnten. Der mechanische Aufschluss fand zu Beginn der Isolierung statt. Die Proben wurde anschließend mit DNA-Extraktionspuffer (DEP) versetzt. Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB) ist ein ionisches De-

Tab. 4.1: Zusammensetzung DE-Puffer.

Stoff	Konzentration	Einwaage[g/l]
Tris	100 mM	12,11
Na-EDTA	100 mM	29,22
Na-Phosphat	100 mM	16,39
NaCl	1,5 M	87,66
CTAB	5%	20,00
mit HCl auf pH 8 eingestellt und autoklaviert		

tergenz und ermöglichte die Komplexierung von Polysacchariden und Proteinen. Es folgte eine enzymatische Behandlung mit Proteinase K, die als Exo- und Endopeptidase wirkte und Lysozym, welches Peptidoglykane spaltet. Ein dreimaliger Temperaturwechsel (von -70°C zu +65°C) denaturierte Proteine und scherte Zellen durch die Wasserkristallisation auf. Die folgende Behandlung mit RNase A spaltete die Phosphordiesterbindung an der 5'-Position der Ribose des jeweils in der RNA-Kette auf U bzw. C folgenden Nukleotids. Mit Natriumdodecylsulfat (SDS) wurden verbliebene Proteine denaturiert und nach zweistündiger Inkubation bei 65°C, abzentrifugiert. Der

Überstand wurde vorsichtig abgenommen und erneut in DE-Puffer gewaschen. Verbliebene Detergentien wurden mit Chloroform und Isoamylalkohol entfernt, während sich ein Zweiphasensystem bildete. In der wässrigen Phase (oben) sammelten sich die Nukleinsäure, die mit Isopropanol gefällt wurden. Im anschließenden Zentrifugationsschritt pelletierte die DNA und konnte somit mit Ethanol gewaschen werden. Das Pellet wurde final in 25 µl autoklaviertem Reinstwasser aufgenommen und entweder über Nacht bei 4°C oder bei 65°C für fünf Minuten resuspendiert.

4.1.2 Konzentrationsbestimmung der Nukleinsäuren

Die Konzentrations- und Reinheitsbestimmung der isolierten DNA wurde photometrisch per Nano-Drop (PEQLAB Biotechnologie GMBH, Erlangen) ermittlet. Dafür wurden 2 µl der Probe gegen das Lösungsmittel gemessen. Neben einer Konzentration in ng/µl wurde auch die Reinheit der Probe durch den Quotienten $A_{(260/280)}$ ausgegeben. Hierbei handelt es sich um die Wellenlängen in nm bei denen DNA bzw. Protein spezifisch vermessen werden können.

4.1.3 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese ermöglichte das analytische und präparative Auftrennen von DNA. Hierfür wurde 1% (w/v) Agarose in 1 x Tris-Acetat-EDTA-(TAE)-Puffer unter Erwärmung vollständig gelöst, in die horizontale Gelkammer gegossen und mit einem entsprechenden Probenkamm versehen. Das auspolymerisierte Gel wurde mit 1 x TAE Puffer überschichtet. Anschließend konnte der Kamm entfernt werden. In die so entstandenen Taschen wurden die elektrophoretisch zu trennenden Probe gegeben. Für 50 Minuten wurde 90 V und 400 mA an das Gel angelegt. Auf Grund der starken negativen Ladung des Phosphatrückgrats wanderte die DNA im elektrischen Feld Richtung Anode. Die Agarose wirkte wie ein molekulares Sieb und ermöglicht eine logarithmische Auftrennung nach der Größe der DNA. Ein Marker diente der Abschätzung der Bandengrößen. Im Anschluss an die Auftrennung wurde das Gel entnommen und in einem Ethidiumbromidbad (1 µg/ml) gefärbt. Der Farbstoff interkalierte mit DNA und machte sie somit bei einer Anregungswellenlänge von λ= 254 nm in einer Geldokumentation sichtbar.

4.1.4 rDNA-Polymerase-Kettenreaktion

In einer rDNA-Polymerasekettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) wurden die Proben mit Hilfe kurzer komplementärer Oligonukleotide sowie einer temperaturstabilen Taq-Polymerase spezifisch amplifiziert. Die ideale Schmelztemperatur (T_M) der Oligonukleotide wurde zuvor be-

rechnet. Die reale Anlagerungstemperatur lag in den Ansätzen etwas unterhalb der theoretischen Werte. Die allg. Formel lautet:

$$T_M = [(G + C) * 4] + [(A + T) * 2] \tag{4.1}$$

mit A, C, G, T Anzahl der entsprechenden Nukleobasen

Die Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide sind in Tab.: 4.2 dargesellt.

Tab. 4.2: Oligonukleotide. Aufgeführt werden alle während der molekularen Analyse verwendeten Primerpaare. Sie werden mit der Zieldomäne, ihrer Orientierung, Nukleotidsequenz und einer Literaturreferenz angegeben. Für die 16S rDNA-Analysen wurden neben archaeellen auch bakterielle Primer eingesetzt. Bei der Kolonie-PCR bindet der Primer im Vektor und ist somit universell. Der Eukaryotenprimer diente als Nachweis in der 18S rDNA-Analyse. Orien.: Orientierung.

Domäne	Orien.	Nukleotidsequenz 5' zu 3'	Referenz
		Prokaryoten	
Bakterien	fwd.	AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG	[Orphan *et al.*, 2001]
Bakterien	rev.	GGT TAC CTT GTT ACG ACT T	[Orphan *et al.*, 2001]
Archaeen	fwd.	TTC CGG TTG ATC C(CT)G CC(AG) G	[Orphan *et al.*, 2001]
Archaeen	rev.	TTC GGC GTT GA(AC) TCC AAT T	[Orphan *et al.*, 2001]
		Kolonie-PCR	
A+B	fwd.	GTA AAA CGA CGG CCA G	Invitrogen
A+B	rev.	AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG	Invitrogen
		Eukaryoten	
Eukaryoten	fwd.	AAC CTG GTT GAT CCT GCC AGT	[Behnke *et al.*, 2006]
Eukaryoten	rev.	TGA TCC TTC TGC AGG TTC ACC TAC	[Behnke *et al.*, 2006]

Der PCR-Ansatz wurde auf Eis pipettiert und setzte sich dabei entsprechend [Tab. 4.3] zusammen.

Tab. 4.3: PCR-Ansatz. Die Zusammensetzung des Standard-Mastermixes pro Ansatz ist angegeben. Das Template wurde entsprechend seiner Konzentration eingesetzt und bei konstantem Volumen der anderen Reaktionsteilnehmer mit autoklaviertem Reinstwasser auf 25 µl aufgefüllt.

Volumen [µl]	Reagenzien und Puffer
X	Template
2,5	Promega Flexi-Puffer
2,5	25 mM $MgCl_2$
2,5	2 mM dNTPs
1	10 pmol/µl fwd. Primer
1	10 pmol/µl rev. Primer
0,2	Promega *Taq*-Polymerase
1	BSA
X	autoklaviertes Reinstwasser

Es wurden 2 ng DNA als Template eingesetzt, das Volumen variierte somit je nach Konzentration des Templates. Mit autoklaviertem Reinstwasser wurde der Ansatz auf 25 µl Gesamtvolumen auf-

gefüllt. Das PCR Programm lautet dabei wie folgt:

Tab. 4.4: PCR-Programm. Der erste Schritt dienten der Initiation, Schritte 2-4 enthielten die zyklischen Abfolgen von Denaturierung, Anlagerung und Elongation. Nach Abschluss der eigentlichen Amplifikation verblieb der Thermo-Cycler bis zur Entnahme der Proben bei 4°C. Bei dieser Temperatur waren enzymatische Aktionen minimal. Die Anlagerungstemperatur richteten sich nach den verwendeten Primern, die entsprechende Berechnungsformel ist im Text angegeben.

Schritt	Dauer [s]	Temperatur [°C]	Wiederholung
1	300	95	
2	30	95	
3	45	50	
4	90	72	29 x zurück zu Schritt 2
5	600	72	
6	∞	4	

Ein PCR-Programm besteht während der Zyklen aus drei verschiedenen Temperaturstufen: Bei 95°C denaturiert die doppelsträngige DNA (dsDNA) zu Einzelsträngen (ssDNA), bei 50°C erfolgt das sog. *Annealing*, das Anlagern der Primer, 72°C ist anschließend die optimale Temperatur für die thermostabile *Taq*-Polymerase. In der Elongationsphase amplifiziert sie das Template. Das Herunterkühlen des PCR-Ansatzes auf 4°C minimiert die Enzymaktivitäten.
Die PCR-Produkte wurden anschließend über ein 1%iges Agarosegel aufreinigt oder analysiert. Nach 40 Minuten bei 400 mA und 90 V waren die Bande für Archaeen bei etwa 1000 Basenpaaren (bp), die für Bakterien bei etwa 1500 bp zu erwarten.

4.1.5 Gelextraktion

Um für die weiteren Arbeiten möglichst reine Ziel-DNA zu erhalten, wurden die Banden exakt aus dem Gel ausgeschnitten mit Hilfe das *NucleoSpon Extract II*-Kit von Macherey-Nagel aufgereinigt. Dabei wurde das Gel bei Hitze in Puffer aufgelöst und die DNA über eine Silikamatrix isoliert. Die Reinheit der so gewonnenen DNA konnte wiederum photometrisch per NanoDrop bestimmt werden.

4.1.6 Ligation

Die amplifizierten PCR-Produkte wurden in den TOPO-TA-Cloning Vektor pCRII ligiert. Dazu wurden 2 µl des aufgereinigten PCR-Produkts mit 0,5 µl entsprechender Pufferlösung sowie 0,5 µl des TOPO pCRII Vektors (10 ng/µl) versetzt, kurz anzentrifugiert und über Nacht bei 16°C

inkubiert.

4.1.7 Transformation in *E. coli*

Das Ligationsprodukt wurde in DH5α *E. coli* SOB Zellen transformiert [Hanahan, 1983] Dazu wurde der vollständige Ligationsansatz und 200 µl DH5α E. coli SOB Zellen vermengt und für 45 Minuten auf Eis inkubiert. Danach erfolgte ein Hitzeschock für 90 Sekunden bei 42°C im Heizblock, anschließend die Zugabe die von 1 ml SOC-Medium und eine erneute Inkubation auf Eis für zwei Minuten. Nach einer Stunde bei 37°C auf einem Orbitalschüttler wurden die Bakterien auf LAXI-Platten ausplattiert. LAXI steht hierbei für eine Kombination aus Lysogeny Broth (LB) [Bertani, 1951], Agar, X-Gal und IPTG. Diese ermöglichen die Blau-Weiß-Selektion.
Das Enzym β-Galactosidase hydrolysierte neben dem natürlichen Substrat Lactose (Galactose und Glukose) auch das Analogon X-Gal zu Galactose und 5-Brom-4-chlor-3-hydroxyindol. Letzteres oxidiert mit Luftsauerstoff zu dem charakteristisch blauen 5,5'-Dibrom-4,4'-dichlor-indigo. In dem verwendeten Klonierungsvektor pCRII befand sich die *multiple cloning site* in dem Gen für das αPeptid der β-Galactosidase. Durch die Ligation wurde dieses Gen unterbrochen und konnte nicht mehr abgelesen werden. Das αPeptid wurde folglich nicht gebildet und auch die Spaltung des X-Gals blieb aus. Demnach enthielten weiße Kolonien den Vektor mit dem gewünschten Insert, blaue Kolonien zeigten eine negative Ligation an. Durch das zweifache Ausstreichen der Kolonien wurde eine möglichst genaue und sichere Auswahl der Kolonien gewährleistet.

Tab. 4.5: LAXI-Platten. Diese Form der angereicherten Festmedien ermöglichte neben der Anzucht der Bakterien auch ein Überprüfung der Klonierung per Blau-Weiß-Selektion.

Volumen [ml]	Masse [g]	Substanz
	25	LB-Pulver
	15	Agar
nach dem Autoklavieren werden hinzugefügt		
2		X-Gal (20 mg/ml)
2		IPTG (0,1 M)
1		Ampicillin

Die noch warme Lösung wurde blasenfrei in Petrischalen gegossen, nach dem Aushärten getrocknet und bei 4°C in der Dunkelheit gelagert.

Weiße Klone wurden in eine Masterplatte transferiert und so gelagert. Dafür wurden in einer 96-well Mikrotiterplatte (MTP) pro Vertiefung 150 µl LB-Amp vorgelegt. Anschließend wurde mit autoklavierten Zahnstochern Kolonien von der LAXI-Platte gepickt und in eine eigene Vertiefung überführt. Waren alle Vertiefungen angeimpft wurde die MTP erneut über Nacht bei 37°C inku-

biert und anschließend mit 50 µL LB-AMP/ DMSO in einem Verhältnis von 3:1 überschichtet. Diese Platten können über lange Zeit bei -20°C stabil gelagert werden.

4.1.8 Kolonie-PCR

Parallel zum Ansetzten der Masterplatten wurde eine Auswahl von Klonen per Kolonie-PCR überprüft. Dafür wurden in einer MTP 50 µl autoklaviertes Reinstwasser pro Vertiefung vorgelegt und mit dem Inokulum angeimpft. Die MTP wurde danach mit einer wärmestabilen Folie abgeklebt und der Inhalt der Vertiegungen auf einem Heizblock für zehn Minuten bei 100°C denaturiert. Anschließend wurden die Proben auf Eis abgekühlt und für zwei Minuten bei 17000 x g und einer Temperatur von 4°C in der MTP abzentrifugiert. Der Überstand konnte als Template für die Kolonie-PCR eingesetzt werden. Die verwendeten Oligonukleotide hybridisierten mit dem Klonierungsvektor pCRII, so dass sie sowohl für archaeelle als auch bakterielle Proben eingesetzt werden konnten [Tab. 4.2]. Da für die Kolonie-PCR die *Taq*-Polymerase verwendet wurde, setzte sich der Mastermix wie folgt zusammen:

Tab. 4.6: Kolonie-PCR. Die Zusammensetzung des Mastermixes wurde auf die *Taq*-Polymerase abgestimmt. Die domänenunabhängige Primerpaare wurden genutzt.

Volumen [µl]	Reagenz oder Puffer
2	Template
2,5	10fach PCR Puffer
2,5	25 mM $MgCl_2$
2,5	2 mM dNTPs
1	10 pmol/µl M13 fwd. Primer
1	10 pmol/µl M13 rev. Primer
0,5	*Taq* DNA-Polymerase
13	autoklaviertes Reinstwasser

Das PCR-Programm dazu entsprach dem in [Tab. 4.4] dargestellten.

2,5 µl jedes PCR-Produktes wurden mit je 1 µl Ladepuffer versehen und auf ein Testgel aufgetragen. Als Marker diente der TopVision. Die Banden von Archaeen sollten hier bei etwa 1200 bp laufen (1000 bp+200 bp von dem pCRII-Vektor), Bakterien bei 1700 bp (1500 bp+200 bp von dem pCRII-Vektor).

4.1.9 Sequenzierung

Für die Sequenzierung wurden 15 µl des PCR-Produkts vorgelegt und mit 3 µl fwd.-Primer (3,2 pmol/µl) entsprechend für Bakterien oder Archaeen versehen [Tab. 4.2]. Dieser Ansatz wurde

zur weiteren Prozessierung in die erste Medizinische Klinik am Universitätsklinikum Schleswig-Holstein (UKSH) in die AG von Prof. Dr. Schreiber gegeben. Die eigentliche Sequenzierung erfolgte an einem ABI 3730xl DNA Analyzer. Die Sequenzierungsergebnisse wurden in Form von Fluoreszenzdiagrammen zugestellt und konnten über eine entsprechende Software, z.B. Chromas Lite korrigiert und als FASTA-Format ausgegeben werden. Die so ermittelte Sequenzen wurden zuerst mit der NCBI Datenbank abgeglichen und einem entsprechendem *Nucleotide Blast* unterworfen. Dabei wurde klar, dass die Zuordnungen noch nicht spezifisch genug waren. Es folgte ein Einspeisung der Sequenzen [Ludwig *et al.*, 2004] in den ARB tree des Max-Planck-Instituts für marine Mikrobiologie in Bremen Diese *silva database* umfasste ca. 446000 16S rDNA Sequenzen (Stand: Januar 2010).

4.2 18S rDNA-Analyse

Um einen eukaryotischen Einfluss auf die Inkubation und somit die Silikatverwitterung ausschließen zu können, wurde mit EukA-Oligonukleotiden [Tab. 4.2] entsprechend des Protokolls [Tab. 4.3] eine 18S rDNA-Analyse durchgeführt. Die Prozessierung erfolgte entsprechend dem für 16S rDNA beschriebenem Weg.

4.3 Bioinformatische Auswertung

Im FASTA-Format ausgegebene Sequenzen konnten direkt zum Abgleich in Datenbanken wie z.B. NCBI eingespeist und abgeglichen werden. Als Ergebnis wurde eine Liste mit Treffern ausgegeben, die durch einen Erwartungswert (e-value), Sequenzidentität und Sequenzabdeckung charakterisierbar und gegeneinander abwägbar wurden. Für die Analyse stand, auf Grund der Amplifikationsgenauigkeit der Polymerase, lediglich der Bereich zwischen den Basen 60 und 600 zur Verfügung. Zusätzlich konnten die Daten in einen *ARB-Tree* eingespeist werden, wo sie auf Grund von phylogenetischen Zusammenhängen wesentlich sicherer zugeordnet werden konnten.

4.4 CARD-FISH

Catalyzed Reporter Deposition-Fluorescence In Situ Hybridization (CARD-FISH) gehört zu den neueren molekularen, bildgebenden Methoden, mit der die Markierung und Visualisierung von ausgewählten Bakterien und Archaeen *in situ* möglich ist. Als Sonde wird eine Oligonukleotidsequenz von ca. 20 bp konstruiert, die zu einer spezifischen Region der 16S rRNA des Ziel-

organismus komplementär ist [Sekar *et al.*, 2003]. Das für die vorliegende Proben verwendete CARD-FISH-Protokoll basiert auf den Vorgaben von Pernthaler [Pernthaler *et al.*, 2002] und Ishii [Ishii *et al.*, 2004] und wurde für die Anwendung an Kristallen verändert. Dabei lieferte Erin Banning wertvolle Hinweise [Banning, 2006]. Für die CARD-FISH-Analyse wurden Silikate aus allen Mikrokosmen verwendet, die mit Eisenreduzierermedium inkubiert worden waren. Im Text werden nur die Puffer genannt, die stets frisch zubereitet werden mussten.

Sonden

Die CARD-FISH-Färbungen der vorliegenden Arbeit basieren auf zwei verschiedenen Sonden und Farbstoffen. Die Sonde EUB338 ist gegen die meisten Bakterien gerichtet (5'-GCTGCCTCCCGTAGGAGT-3' [Amann *et al.*, 1990]). Für den spezifischen Nachweis von *Shewanella putrefaciens* wurde die Sonde SPN3 verwendet (5'-CCGGTCCTTCTTCTGTAGG TAACGTCACAG-3' SPN3 [McLeod *et al.*, 2002]). Beide Sonden waren direkt an eine Meerrettichperoixdase (*horseradish peroxidase*, HRP) gekoppelt. Als Label standen Alexa488 und Alexa546 zur Verfügung. Die Zahlenwerte geben dabei die zugehörige Anregungswellenlänge in nm an.

Probenfixierung

Nachdem die Silikate den Mikrokosmen entnommen worden waren, wurden sie in einer mit PBS verdünnten 4%igen Formaldehydlösung für vier Stunden fixiert. Alternativ könnte auch Salzwassermedium zur Verdünnung eingesetzt werden, beide Stoffe verhindern osmotischen Stress. Bei der Fixierung verband Formaldehyd primäre Aminogruppen von Proteinen irreversibel über eine CH_2-Brücke mit benachbarten Stickstoffatomen in anderen Proteinen oder der DNA. Die Kristalle wurden der Lösung entnommen und in 1 x PBS gewaschen. Die anschließende Lagerung erfolgt unter 1 x PBS/ EtOH bei -20°C.

Probenprozessierung

Für die Probenbearbeitung empfiehlt es sich die Kristalle entweder auf Objektträgern zu fixieren und dann in großen Petrischalen zu prozessieren oder die Kristalle in eine 96 well MTP zu überführen. Um einem Zellverlust durch u.a. mechanische Kräfte zu verhindern, wurden die Proben mit 0,2%iger Agarose besprüht. Nach dem Trocknen wurden endogene Peroxidasen bzw. Proteine mit einer Pseudoperoxidaseaktivität inaktiviert, um falsch positive Signale zu vermeiden. Für die Inaktivierung wurden die Kristalle für eine Minute in 0,1 M HCl inkubiert, mit 1 x PBS gewaschen und anschließend für 30 Minuten in einer 3%igen H_2O_2-Lösung bei Raumtemperatur inkubiert.

Es folgte die Permeabilisierung der Zellen um sie für den Eintrag der Sonden und Label suszeptibel zu machen. Hierfür wurden 10 mg/ml Lysozym (10000 U) in 0,05 M EDTA (pH 8) und 0,1 M Tris-HCl gelöst. In dieser Lösung inkubierten die Kristalle für eine Stunde bei 37°C. Nach einem Waschschritt in autoklaviertem Reinstwasser und anschließender Trocknung in 96%igem EtOH konnten die Proben über mehrere Monate bei -20°C gelagert werden.

Hybridisierung

Neben der Eubacteria-Sonde EUB388 wurde eine *Shewanella putrefaciens* Sonde verwendet. Für die Hybridisierung wurde 1 µl Sonde (50 ng/µl) mit 299 µl passendem Hybridisierungspuffer vermischt. Bei den vorliegenden Sonden fand der 35%ige Puffer Anwendung. Die Kristalle wurden mit dieser Lösung bedeckt und für vier Stunden bei 35°C inkubiert. Für die vorliegende Arbeit fanden zwei Sonden in der Doppelhybridisierung Anwendung. Protokolle für CARD-FISH auf Filtern empfehlen eine zweistündige Hybridisierung bei 46°C in der Rotation, wovon auf Grund der hohen mechanischen Belastung der Kristallen abgesehen wurde [Pernthaler *et al.*, 2002]. Stattdessen wurden die Proben bei 35°C statisch inkubiert. Nach Abschluss der Hybridisierung wurden die Kristalle in Puffer (48°C) für zehn Minuten gewaschen. Der Waschpuffer setzte sich dabei wie folgt zusammen: Um die HRP-gekoppelten Sonden zu equilibrieren wurde der Kristall

Tab. 4.7: CARD-FISH Waschpuffer. Gegeben ist die Komposition des frisch angesetzten Waschpuffers.

Volumen [µl]	Stoff
700	5 M NaCl
1000	1 M Tris-HCl
500	0,5 M EDTA
50	10% SDS
47500	H_2O

anschließend in 1 x PBS für 15 Minuten bei Raumtemperatur gewaschen und anschließend leicht getrocknet. Ein vollständiges Abtrocknen des Kristalls sollte zu diesem Zeitpunkt vermieden werden, um die Aktivität der HRP nicht zu beeinträchtigen.

CARD

Die im Folgenden beschrieben Schritte sind stark lichtempfindlich. Daher wurde das Labor bis auf indirektes Minimallicht verdunkelt und die Proben zusätzlich unter einer lichtdichten Abdeckung bearbeitet. Falls sich diesen Schritten eine weitere Hybridisierung anschließt (Doppelhybridisierung) müssen auch diese Schritte möglichst unter Lichtausschluss ablaufen. Zunächst wurde eine 0,15%ige H_2O_2-Lösung in PBS angesetzt. 10 µl dieser Lösung wurden mit 1 ml Amplifikati-

onspuffer und 1 µl fluoreszenzmarkiertem Tyramid versehen. Die Inkubationsdauer betrug 15 Minuten bei 46°C und wurde durch einen weiteren Waschschritt mit 1 x PBS für zehn Minuten in der Dunkelheit abgeschlossen. Für die Doppelhybridisierung schlossen sich jetzt erneut eine Inaktivierung der endogenen Peroxidasen, sowie eine erneute Hybridisierung und CARD an. Zwischen Inaktivierung der Peroxidasen und erneuter Hybridisierung empfiehlt sich ein Waschschritt mit 1 x PBS. Nach Durchlauf des zweiten CARD-Protokolls wurden die Kristalle dreimal für je zwei Minuten in PBS, dann in autoklaviertem Reinstwasser und schließlich in 96%igem EtOH gewaschen. Nach Lufttrocknung konnten die Kristalle bei -20°C lichtgeschützt eingefroren werden.

DAPI

Bei DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol) handelt es sich um ein Fluoreszenzfarbstoff der bei 358 nm absorbiert und 461 nm emittiert. Diese charakteristische blaue Färbung wird für spezifische DNA-Färbung verwendet und ermöglicht gleichzeitig die Verwendung von weiteren Fluoreszenzfarbstoffen. Die Kristalle wurden dazu mit einer 10 µg/ml konzentrierten Lösung benetzt und für 30 Minuten in der Dunkelheit inkubiert, ein Waschschritt mit 80%igem EtOH verhinderte unspezifische Signale.

Mikroskopie

Für die Mikroskopie der Kristalle fanden zwei verschiedene Systeme Anwendung. Neben einem Epifluoreszenzmikroskop wurde für genauere Analyse ein konfokales Laser-Scanning-Mikroskop eingesetzt. Hiermit sollte der herausfordernden Topographie der Kristalle Rechnung getragen werden. Für die Mikroskopie wurde ein Kristall auf einem Objektträger positioniert und im Bedarfsfall mit 1%iger Agarose stabilisiert. Es folgte die Applikation von Citifluor, um ein Bleichen der Fluoreszenzfarbstoffe zu reduzieren. Da dieses Reagenz auf Glycerinbasis beruhte hatte es keinen negativen Effekt auf die Brechungsindizes. Ein Deckgläschen wurde schließlich auf dem Kristall platziert und mit einem Tropfen Immersionsöl bedeckt. Alle Arbeiten fanden bei Minimallicht statt. Die Bilder und Einstellungen wurden digital gespeichert und mit der entsprechenden Software prozessiert.

Tab. 4.8: Filter der Epifluoreszenzmikroskopie.

Filtersatz	Anregungsfilter [nm]	Farbteiler [nm]	Emissionsfilter [nm]	Anwendung
L5	BP 480/40	505	BP 527/30	Alexa488
Y3	BP 545/30	565	BP 610/75	Alexa546
A	BP 340-380	400	LP 425	DAPI

5 Ergebnisse

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse der Inkubationsexperimente in den Mikrokosmen dargestellt. Die Daten für die Equilibrierungsphase, sowie die Inkubation in den undichten Inkubationsgefäßen werden ausgespart, da sich die Werte nicht vom Hintergrundsignal abhoben.

5.1 Analysen, periodisch

In den periodischen Analysen wurden Sulfidentwicklung im Sulfatreduzierermedium, Methanogenese im Methanogenenmedium, Eisenreduktion in den Mikrokosmen mit Eisenreduzierermedium sowie die CO_2-Entwicklung im Fermentierermedium gemessen.

5.1.1 Sulfid

Die photometrisch bestimmten Sulfidwerte zeigten bis zum 38. Inkubationstag keinen Anstieg über das Detektionsminimum. Nach 51 Tagen Inkubation in den Mikrokosmen zeigte das peruanische Sediment im Sulfatreduzierermedium einen Anstieg in der Sulfidkonzentration von 2 auf 6 mM [Abb. 5.1]. Zum Abschluss des Experiments, nach 70 Inkubationstagen, lag die Konzentration von HS^- in der nicht mit Silikat inokulierten Probe bei 27,98 mM, die mit Silikat inokulierten Proben erreichten 22,5 mM bei der Bytownitinkubation bzw. 22,9 mM bei der Orthoklasinkubation. In den anderen inkubierten Sedimenten wurde über den gesamten Zeitraum kein Sulfidanstieg gemessen. Gleiches gilt für die identisch behandelten Mediumkontrollen.

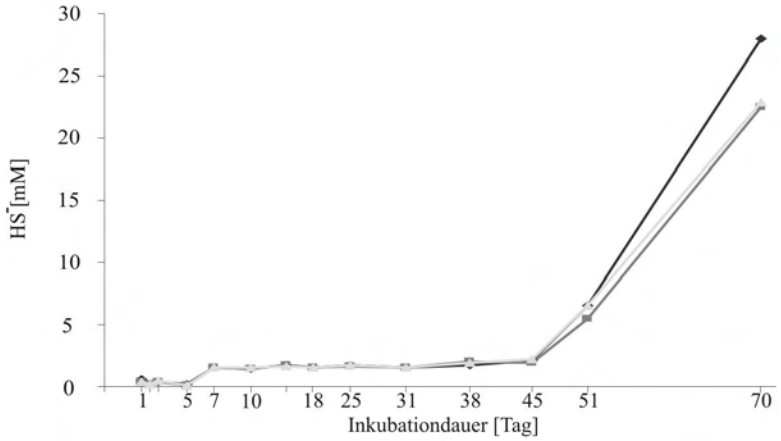

Abb. 5.1: HS^--Entwicklung in peruanischem Sediment. Die HS^--Entwicklung in peruanischem Sediment angegeben in mM, aufgetragen gegen die Zeit. Inkubation ohne Silikat (schwarz,●); Inkubation mit Bytownit (grau, □); Inkubation mit Orthoklas (hellgrau, △).

5.1.2 Methan

In den Methankonzentrationen der vier inkubierten Sedimente zeigten sich Differenzen. Während der Kern aus dem Sakhalin Trog weder in der Sulfatreduziererzone, noch in der tiefer liegenden Methanogenenzone eine Methanproduktion zeigte, konnte ein zuletzt Anstieg in den Proben aus Peru vermerkt werden [Abb. 5.2]. Nach 25 Tagen Inkubation der peruanischen Proben in Methanogenenmedium wurden erstmals Methanwerte von 100 ppmv überschritten, nach 51 Tagen hatten sich die Werte für die mit dem Silikat Orthoklas inokulierten Proben bereits auf über 400 ppmv vervierfacht. Nach 70 Tagen Inkubation wurden in der Bytownitinkubation ein Maximalwert von 705 ppmv gemessen. Die Proben aus dem Okinawa Trog zeigten schwankende Werten zwischen 0 und 95 ppmv, allerdings im fehlerbehafteten, außerhalb des Kalibrierungsbereichs liegendem Messfeld. Zudem waren diese Werte nicht persistent. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass methanogene Archaeen im Sediment vorhanden waren, allerdings auf Grund der kürzeren Inkubationszeit noch nicht ausreichend CH_4 bilden konnten. Die Kontrollexperimente zeigten leichte Schwankungen zwischen 0 und 20 ppmv und zeigen keinen Trend.

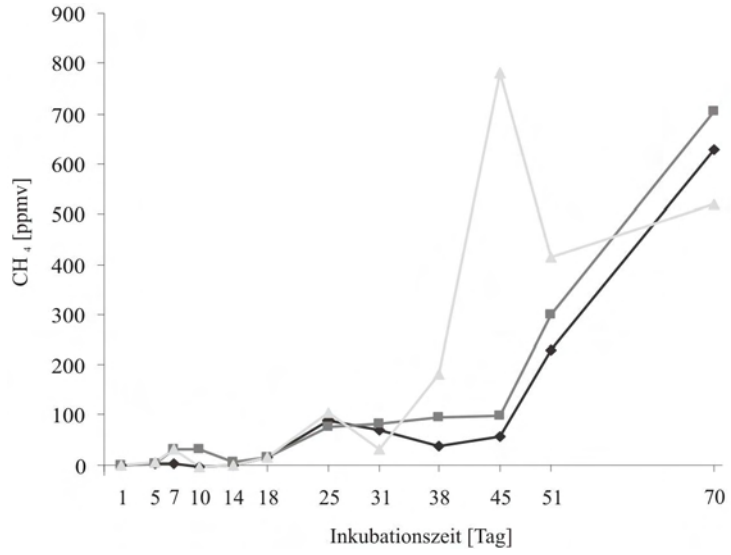

Abb. 5.2: Methanogenese in peruanischem Sediment. Die Methanentwicklung in ppm wurde gegen die Probenzeit aufgetragen. Inkubation ohne Silikat (schwarz,●); Inkubation mit Bytownit (grau, □); Inkubation mit Orthoklas (hellgrau, △).

5.1.3 Eisen

In den folgenden Abbildungen wurden die Konzentrationen der Eisenspezies in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer und dem inokulierten Silikat dargestellt. Bei der ersten Analyse der Eisenwerte zeigt sich ein massiver Konzentrationsanstieg zum 25. Inkubationstag. Dieser war unabhän-

gig von dem inkubierten Sediment. Es bestand somit die Möglichkeit, dass hier ein systemischer Fehler vorlag. Die Werte des 25. Inkubationstag werden daher im Folgenden vorerst ausgeklammert. Dem additiven Balkendiagramm [Abb. 5.3] kann der Konzentrationsverlauf der beiden wichtigsten Eisenspezies über den gesamten Inkubationszeitraum entnommen werden. Auffällig war ein Zunahme der Gesamteisenkonzentration in allen Mikrokosmen nach dem 31. Inkubationstag.

Sakhalin Trog, Sulfatreduziererzone [Abb. 5.3 Bildteil A]

Über den gesamten Inkubationszeitraum stellte die Fe(III)-Konzentration den größten Anteil am Gesamteisen mit Werten zwischen 52 und 68%. Am deutlichsten war dieses Verhältnis bei der Bytownitinkubation wo durchschnittlich 63,5% der Eisenspezies auf Fe(III) entfielen. Einen Anstieg der Eisenspezies konnte zum Ende des Experimentes hin verzeichnet werden. In den nicht inokulierten Mikrokosmen vervierfachte sich der Fe(II)-Wert über den Inkubationszeitraum, die Fe(III)-Konzentration versechsfachte sich fast von 3,77 µM/ g_{TM} auf 20,6 µM/ g_{TM}. Damit verschob sich nicht nur die Gesamtkonzentration, sondern auch das Verhältnis der Spezies untereinander. Zum Abschluss der Experimente lag Fe(III) in den Proben in größeren Molaritäten als Fe(II) vor. Dieser Trend zeichnete sich in der mit Bytownit inokulierten Probe bereits über den gesamten Verlauf ab.

Sakhalin Trog, Methanogenenzone [Abb. 5.3 Bildteil B]

Die Inkubationen von Sediment aus der methanogenen Zone des Sakhalin Trogs zeigte eine Gesamteisenkonzentrationen von bis zu 13,6 µM in dem nicht mit Silikat inokulierten Mikrokosmos. Zudem fiel der schnellere Anstieg an detektierbarem Eisen auf. Bereits nach 10 Tagen Inkubation hatte sich der Startwert in z.B. dem mit Bytwonit inokulieren Mikrokosmos von von 2,9 µM zu Beginn auf 9,6 µM mehr als verdreifacht. Die Fe(III)- Konzentration machten etwa 2/3 der Gesamteisenkonzentration aus. In dem mit Orthoklas inokulierten Mikrokosmos zeigte sich ein Anstieg der Fe(II) Spezies über die zweite Hälfte der Inkubationsphase. Der Wert stieg von 1,8 µM am 38. Tag auf 4,9 µM am 70. Tag der Inkubation.

Peru [Abb. 5.3 Bildteil C]

Während der Inkubationsphase des peruanischen Mediums zeigte sich einen sprunghaften Anstieg der Gesamteisenkonzentration zwischen dem 18. und 31. Inkubationstag. Besonders auffällig war der zunächst höhere Fe(II) Anteil am Gesamteisen zu Beginn der Inkubation. Der Fe(III) Anteil sank in dem peruanischen Sediment auf Werte zwischen 42,2% bei den nicht mit zusätzlichem Silikat inokulierten Mikrokosmos und 48,3% bei der Bytownitinkubation. Dieses Verhältnis wurde binnen der ersten sieben Inkubationstage aufgehoben, zum Abschluss der Inkubation zeigt sich in

der Orthoklasinkubation eine Fe(III)-Konzentration von 14,97 µM was einem Anteil von 61,3% am Gesamteisen entsprach.

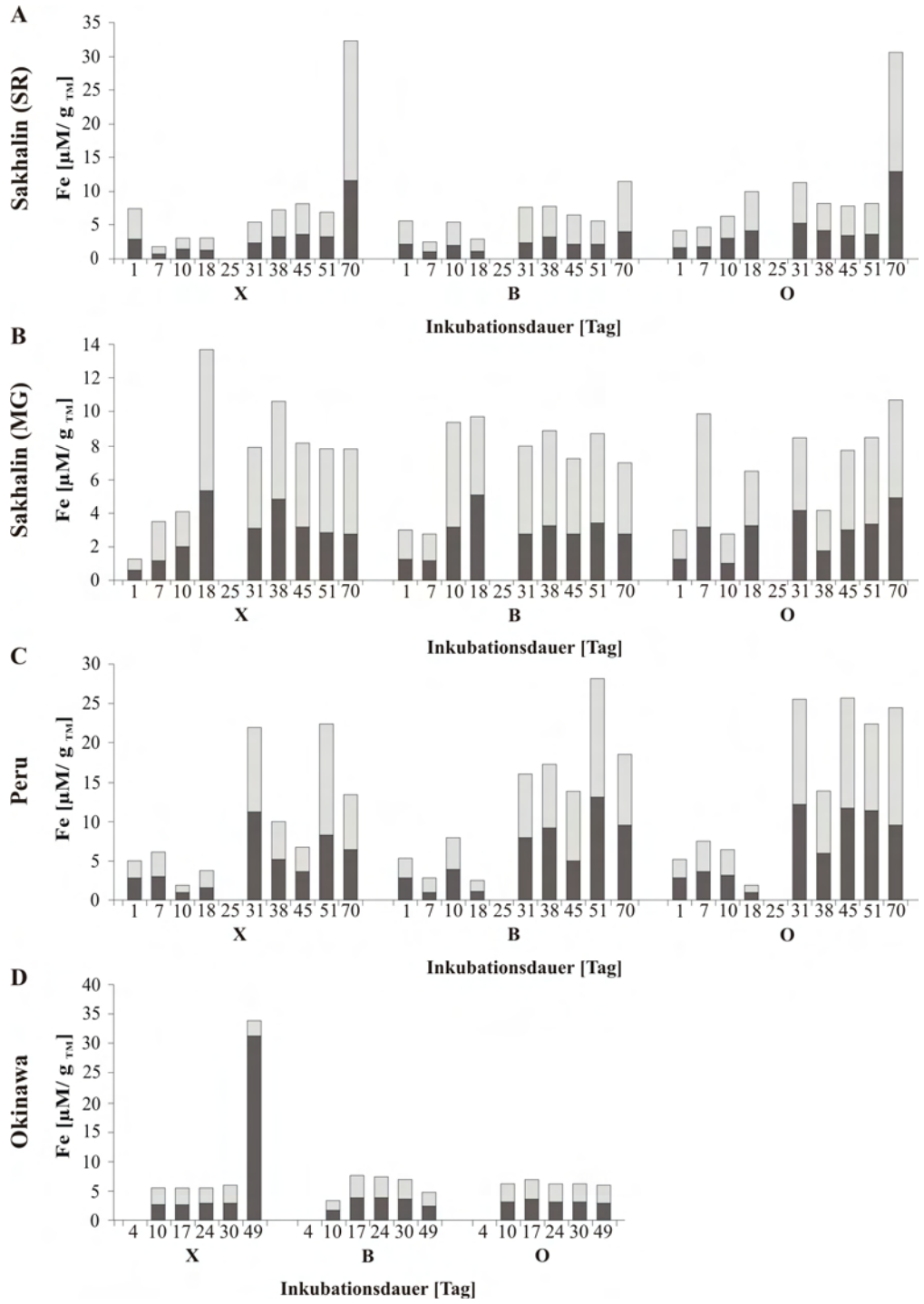

Abb. 5.3: Additive Auftragung der Konzentration der Eisenspezies pro g Trockengewicht gegen die Zeit. Fe(II)- und Fe(III)-Entwicklung in den verschiedenen Sedimenten. **X** Inkubation ohne Silikat; **B** Inkubation mit Bytownit; **O** Inkubation mit Orthoklas. Fe(II) dunkelgrau, Fe(III) hellgrau.

Okinawa Trog [Abb. 5.3 Bildteil D]

Für die Mikrokosmen mit Sediment aus dem Okinawa Trog lagen Werte vom 10 Inkubationstag bis zum Abschluss am 49. Inkubationstag vor. Die Messung am 4. Inkubationstag des Okinawasediments entsprach derjenigen des 25. Inkubationstag der übrigen Sedimente. Sie wies den gleichen systematischen Fehler auf und wurde daher nicht dargestellt. Weder die Fe(II), noch die Fe(III)-Werte zeigten dabei eine Schwankung. Die Fe(III)-Konzentration in der nicht mit zusätzlichem Silikat inokulierten Probe sank während der ersten 20 Tage von 52% auf 47% des Gesamteisens und schließlich am 49. Tag auf 7,6%. Mit diesem rapiden Abfall geht ein extremer Anstieg der Gesamteisenkonzentration von vorher durchschnittlich 5,6 µM auf 33,7 µM einher. Ein solcher Anstieg blieb in den mit Silikat inokulierten Mikrokosmen aus. Dafür veränderte sich das Verhältnis Fe(III) zu Fe(II) zu Gunsten des Fe(II). Der Anteil an Gesamteisen stieg auf knapp über 50%.

5.1.4 CO_2

Die gaschromatographischen CO_2-Messungen erfolgten für alle vier in Fermentierermedium inkubierten Sedimente. Der Anstieg der CO_2-Werte in allen Sedimentinkubationen zwischen dem 56. und 73. Inkubationstag erfolgte parallel in allen gemessenen CO_2-Proben unabhängig von Sediment, bisheriger Inkubationsdauer oder inokuliertem Silikat. Da die Kontrollen keine Veränderung zeigten, ist davon auszugehen, dass es sich bei dem Anstieg um einen biogeochemischen Effekt handelt. Während der gesamten Inkubationsphase wurden die Proben auch auf andere Komponenten in der Gasphase untersucht. Ein Eintrag von O_2 oder anderen Gasen ist auf den Chromatogrammen nicht zu erkennen.

Sakhalin Trog, Sulfatreduziererzone [Abb. 5.4 Bildteil A]

Die Proben aus dem oberen Sakhalinsediment zeigten eine tendenzielle Abnahme der CO_2-Konzentration über den Inkubationszeitraum von etwa 1%. Auffällig sind die Werte für die Orthoklasinkubation. Bei einem Startwert von 11,5% CO_2 in der Gasphase stieg der Wert über den Inkubationszeitraum auf 13,8% an. Zudem konnte am 52. Inkubationstag kein verlässlicher Wert gemessen werden.

Sakhalin Trog, Methanogenenzone [Abb. 5.4 Bildteil B]

Die CO_2-Entwicklung in dem methanogenen Sediment des Sakhalin Trogs war homogener als in dem Sediment der Sulfatreduziererzone. Über die ersten 56 Inkubationstage fielen die CO_2-Anteile

in allen Inkubationen im Schnitt um 1%. Die stärkste Abnahme war dabei in der mit Orthoklas inokulierten Probe zu verzeichnen, die CO_2-Werte fielen im Vergleich zum Startniveau um 1,3%. In allen drei Inkubationen war der o.g. systematische Anstieg der CO_2-Anteile zwischen dem 56. und 73. Inkubationstag messbar, im Fall der Bytownitinkubation wird der Startwert von 12,7% CO_2 um 0,7% übertroffen.

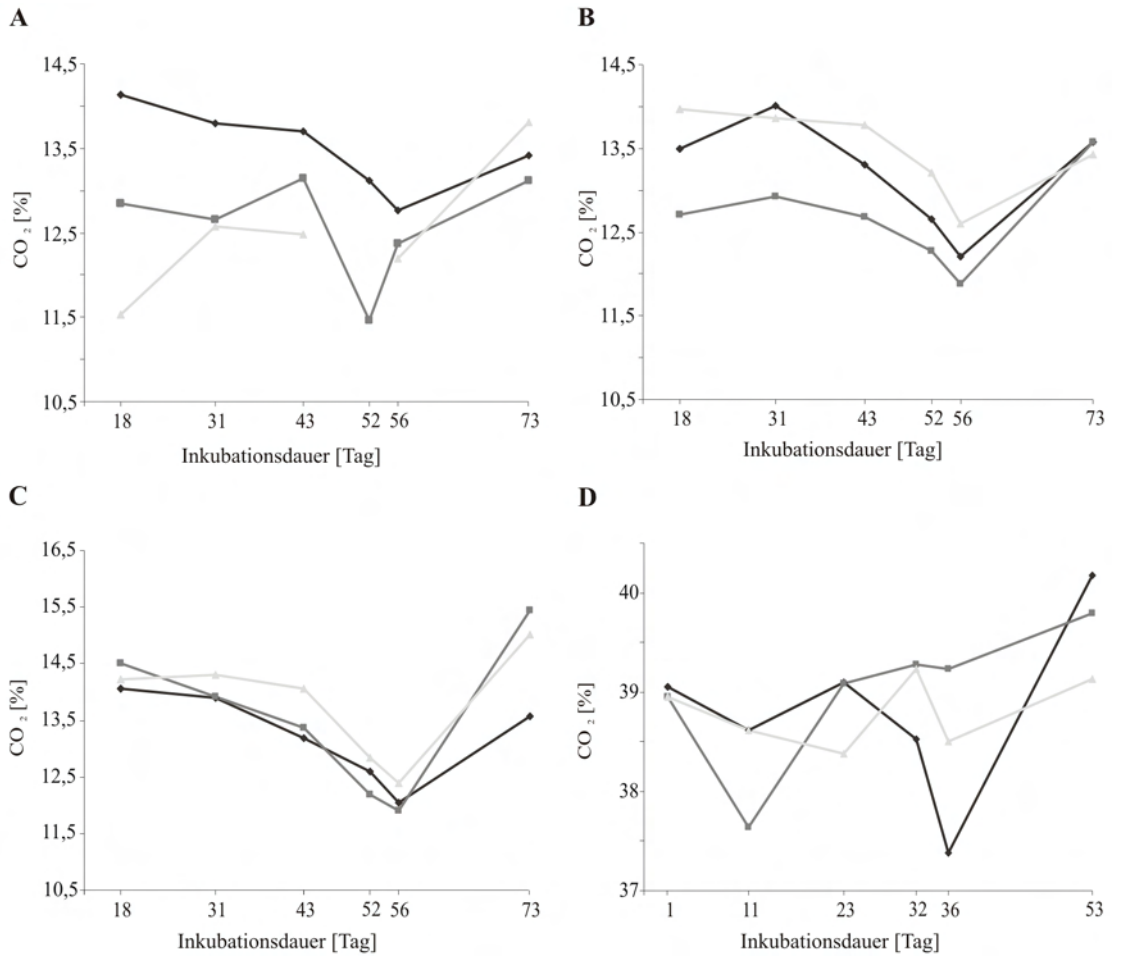

Abb. 5.4: CO_2-Konzentration in der Gasphase aller Sedimente in % Die CO_2-Entwicklung, aufgetragen gegen die Zeit. **A** Sakhalin Trog, Sulfatreduziererzone; **B** Sakhalin Trog, Methanogenenzone; **C** Peru; **D** Okinawa Trog. Inkubation ohne Silikat (◇, dunkelgrau); Inkubation mit Bytownit (□, grau); Inkubation mit Orthoklas (△, hellgrau) aufgetragen gegen die Inkubationszeit in Tagen.

Peru [Abb. 5.4 Bildteil C]

Der gemessene CO_2-Anteil in den peruanischen Proben zeigte einen deutlichen Verlauf. Zwischen Beginn der Inkubation und dem 56. Inkubationstag wurden Änderungen von bis zu Δc = -2,6% in dem mit Bytownit inokuliertem Mikrokosmos gemessen. Auch die Werte in dem mit Orthoklas inokuliertem bzw. dem nichtinokulierten Mikrokosmen sanken bis zum 56. Inkubationstag um 2%.

Okinawa Trog [Abb. 5.4 Bildteil D]

Die Proben aus dem Okinawa Trog zeigten unregelmäßige Veränderungen im CO_2-Anteil. Bis zum 36. Inkubationstag fiel der CO_2-Anteil in dem nicht zusätzlich mit Silikat inokuliertem Mikrokosmos um 1,7% ab, während die CO_2-Wert in der Orthoklasinkubation konstant blieben. Der CO_2-Anteil in der Bytownitinkubation sank zum elften Inkubationstag von 39% auf 37,2% und stieg anschließend wieder auf Werte leicht oberhalb des Ausgangasniveaus. Zum 36. Inkubationstag hatte sich der CO_2 Anteil in der Gaspahse um 0,3% vergrößert. Der bereits erwähnte CO_2-Anstieg zwischen den letzten beiden Messungen wurde auch in den Mikrokosmen mit Okinawasediment deutlich. Am stärksten stiegen die CO_2-Werte in dem nicht zusätzlich mit Silikat inokulierten Mikrokosmos von 37,4% auf 40,2%.

5.2 Analysen, aperiodisch

Die im folgenden dargestellten Ergebnisse stammen von den aperiodischen Messungen zur Bestimmung der Silikatkonzentration, der einzelnen Elemente sowie der Analyse der organischen Säuren. Im Gegensatz zu den periodischen Analysen sind die aperiodischen nicht auf ein spezielles Medium beschränkt sondern fanden an allen Mikrokosmen statt.

5.2.1 Silikat

Um Verwitterungsreaktionen in den Mikrokosmen quantitativ nachweisbar zu machen, wurde die Si-Konzentration als Proxy gewählt. Silikate bilden als Gerüstsilikate die Grundstruktur der inokulierten Mineralien und einen großen Anteil des eigentlichen Sediments. Auflösungsprozesse würden demnach auch Si-Ionen freisetzten.

Mit Ausnahme des Eisenreduzierermediums lagen die Si-Konzentrationen in alle Kontrollen unter den Werten der eigentlichen Inkubationsexperimente. Bei dem Eisenreduzierermedium lag die Kontrolle bei Werten von bis zu 450 µM.

Die Proben aus der Sulfatreduziererzone des Sakhalintrogs zeigten alle einen Anstieg in der freien Si-Konzentration [Abb. 5.5]. Der größte Anstieg wurde im Fermentierermedium detektiert wo bis zu 420 µM Silikat freigesetzt wurden. Bei allen Proben aus der Sulfatreduziererzone des Sakhalin Trogs, ist kein Unterschied zwischen inokulierten und ohne zusätzliches Silikat inkubierten Proben zu sehen.

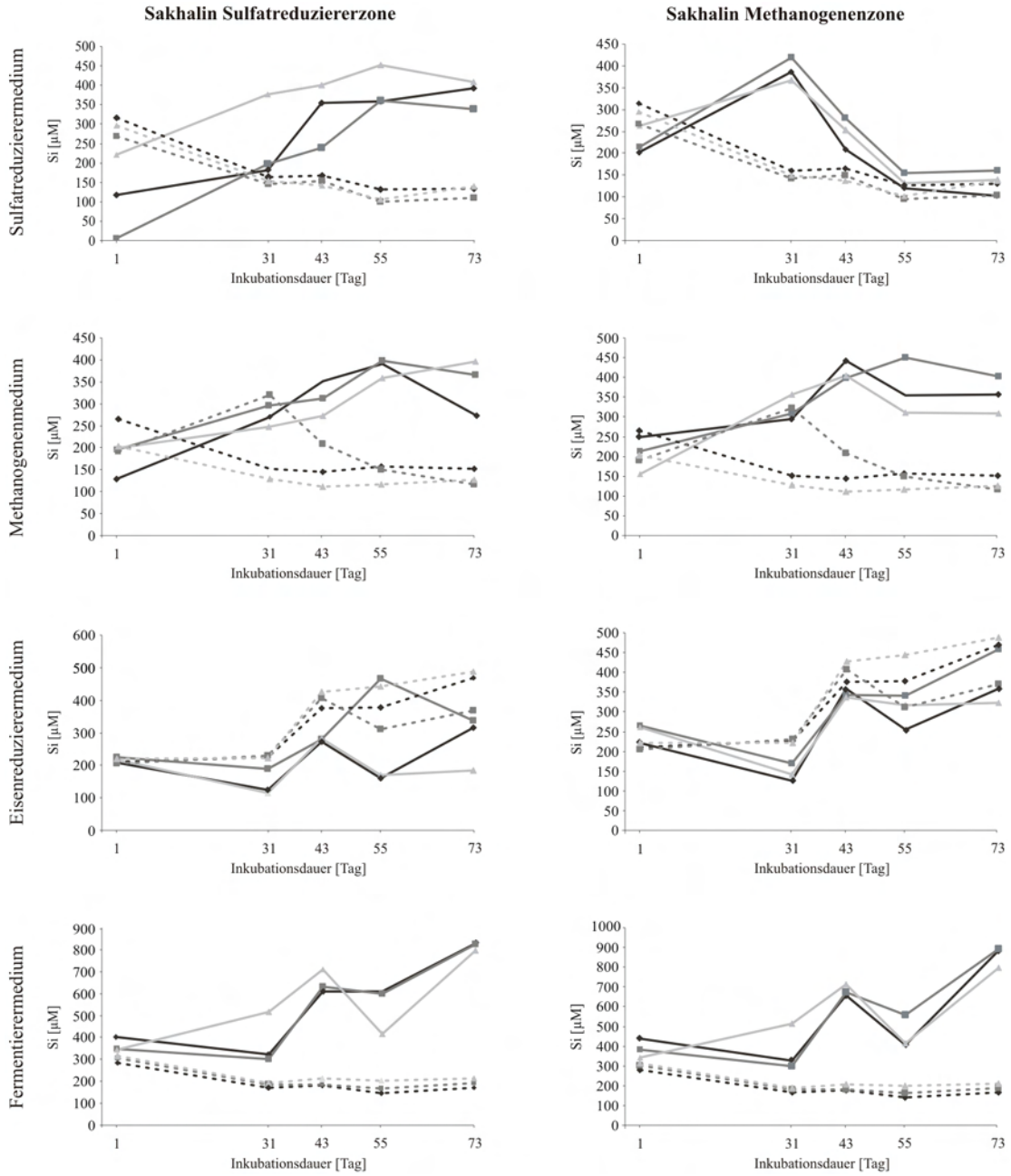

Abb. 5.5: Silikatentwicklung in den Proben den unterschiedlichen Schichten des Sakhalintroges in allen vier Medien. **Silikatentwicklung in Sulfatreduziererzone:** Die Silikatentwicklung wurde für alle vier Medien in der ersten Spalte dargestellt. Dabei sind die inokulierten Silikate: Bytownit (■, dunkelgrau); Orthoklas (△, hellgrau); silikatfrei (◇, schwarz). Kontrollen sind farblich und symbolisch identisch markiert, die Linie ist unterbrochen. **Silikatentwicklung in Methanogenenzone:** Die Silikatentwicklung wurde für alle vier Medien in der zweiten Spalte dargestellt. Dabei waren die inokulierten Silikate: Bytownit (■, dunkelgrau); Orthoklas (△, hellgrau); silikatfrei (◇, schwarz). Kontrollen sind farblich und symbolisch identisch markiert, die Linie ist unterbrochen.

Bei den Proben aus der tieferliegenden methanogenen Zone des Sakhalinsediments zeigten drei der vier Ansätze ebenfalls eine Freisetzung von Silikat, der stärkste Anstieg wurde hier ebenfalls im Fermentieremedium detektiert. Die mit Bytownit inokulierte Probe erreichten eine Sili-

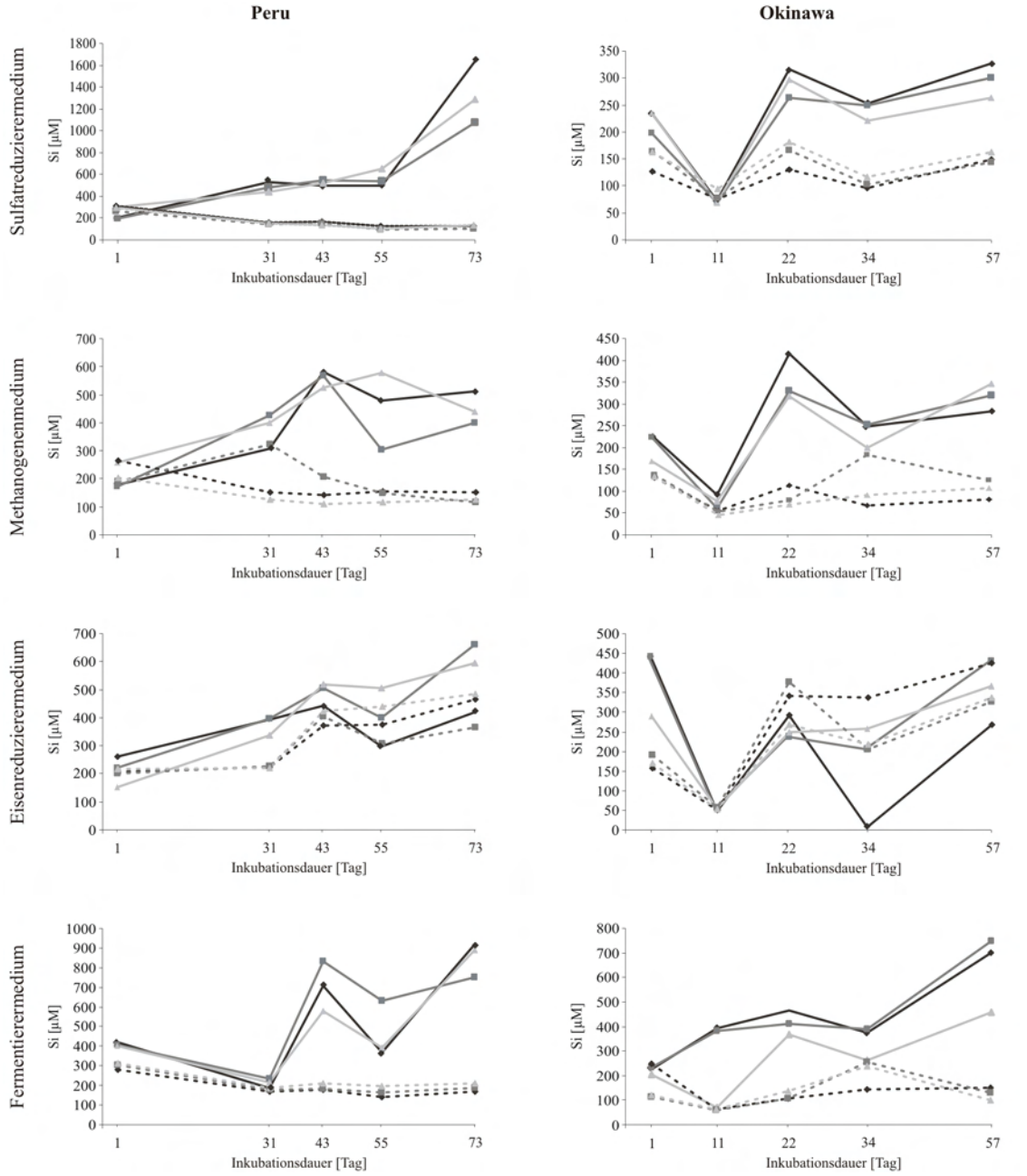

Abb. 5.6: Silikatentwicklung in den Proben aus Peru und Okinawa in allen vier Medien. **Silikatentwicklung in peruanischem Sediment:** Die Silikatentwicklung wird für alle vier Medien in der ersten Spalte dargestellt. Dabei waren die inokulierten Silikate: Bytownit (■, dunkelgrau); Orthoklas (△, hellgrau); silikatfrei (⋄, schwarz).Kontrollen sind farblich und symbolisch identisch markiert, die Linie ist unterbrochen. **Silikatentwicklung in Sediment aus Okinawa:** Die Silikatentwicklung wird für alle vier Medien in der zweiten Spalte dargestellt. Dabei waren die inokulierten Silikate: Bytownit (■, dunkelgrau); Orthoklas (△, hellgrau); silikatfrei (⋄, schwarz). Kontrollen sind farblich und symbolisch identisch markiert, die Linie ist unterbrochen.

katkonzentration von 890 µM. Eine Ausnahme bildete die Inkubation im Sulfatreduzierermedium, Nach einem initialen Anstieg der freien Si-Konzentration fiel der Wert nach 30tägiger Inkubationszeit auf das Konzentrationsniveau der Kontrollen. In den Proben des peruanischen Sediments

war die Silikatfreisetzung generell am Höchsten. Entgegen der bisherigen Ergebnissen wurde bei Inkubationen des peruanischen Sediments der stärkste Anstieg von gelöstem Silikat im Sulfatreduzierermedium gemessen. Der Maximalwert lag bei über 1,6 mM. Die Proben zeigten nach etwa 53 Tagen einen Einbruch in der Silikatkonzentration, die in den meisten Fällen von der Abschlussmessung wieder aufgehoben wurde. Tendenziell zeigten alle peruanischen Proben einen Si-Konzentrationsanstieg über den gesamten Inkubationszeitraum.

Ein positiver Trend war auch in der Si-Konzentration bei den meisten Okinawa-Proben zu messen. Die Freisetzung von Silikaten lag unter den Werten von Peru und zeigte ein eher vergleichbares Verhalten wie die Sakhalin-Proben des sulfatreduzierenden Sediments.

5.2.2 Organische Säuren

Wie in der Einleitung dargelegt, geht eine Hypothese von der mikrobiellen Freisetzung nierdermolekularer organischer Säuren aus, die eine Silikatverwitterung bedingen. Um diese Hypothese zu evaluieren wurden über den Inkubationszeitraum mehrfach 0,5 ml Aliquots der flüssigen Phase pro Mikrokosmos entnommen und die Konzentration der organischen Säuren per HPLC gemessen. Die vorliegenden Analysedaten basieren auf etwa einem Viertel der genommenen Proben. Nachdem sich ein längerer Geräteausfall der HPLC-Anlage in Bremen und somit eine Verknappung dieser Ressource abzeichnete wurde beschlossen, den in Fermentierermedium inkubierten Proben den Vorzug zu geben, da eine Bildung von organischen Säuren durch Fermentierer am wahrscheinlichsten schien.

In den Proben des Sulfatreduziererbereichs des Sakhalinsediments konnte neben Methansäure auch Ethansäure nachgewiesen werden. Letzteres war in höheren Konzentrationen vorhanden (bis zu 6 mM). Während sich bei der nicht mit Silikat inokulierten Probe der Ethansäurewert schrittweise erhöhte, erreichten die mit Silikat inokulierten Systeme bereits am ersten Inkubationstag Werte von durchschnittlich etwa 4 mM, die sie über die Dauer der Inkubation hielten. Die gemessenen Methansäurewerte stiegen zu Beginn der Inkubation auf 200 µM und fielen über die Zeit auf etwa ein Zehntel ab.

In den Sedimenten der Methanogenen Zone des Sakhalin Trogs konnten vier verschiedene organische Säuren nachgewiesen werden. Neben steigenden Ethansäurekonzentrationen im mM-Bereich, wurde neben Milchsäure in fallenden Konzentrationen auch Methansäure und Propansäure nachgewiesen. Die Propansäurekonzentration lag bei etwa 100 µM und stieg zum Ende der Inkubation tendenziell an. Ähnlich verhielt sich Methansäure, die Werte waren jedoch eine Zeh-

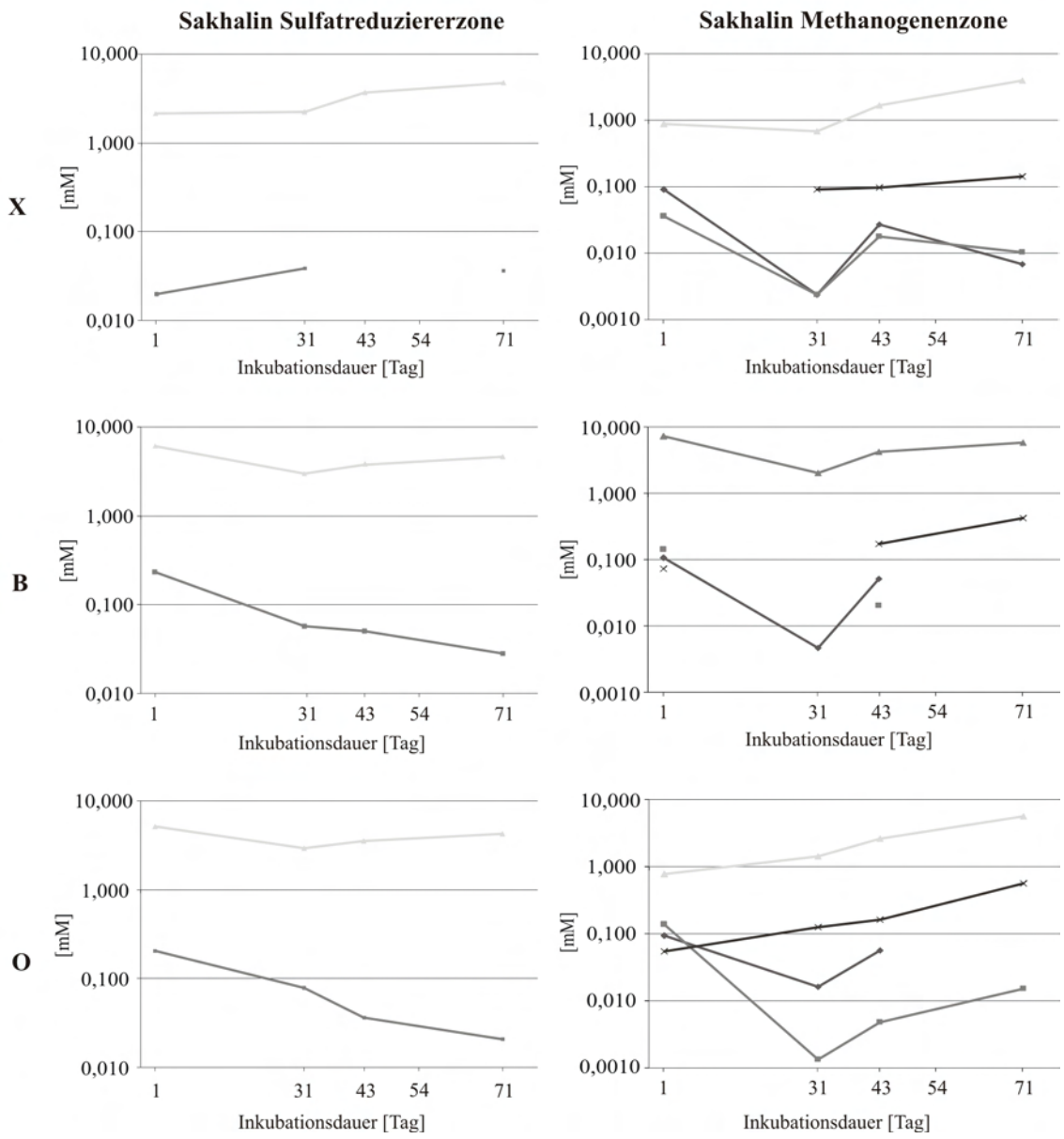

Abb. 5.7: Konzentration ausgewählter organischer Säuren in den Mikrokosmen mit Sakhalinsedimenten über den Inkubationszeitraum. Die molaren Konzentrationen von Methansäure (■, grau); Ethansäure (△, hellgrau); Propansäure (×, dunkelgrau) und Milchsäure (◇, grau) in den wurden logarithmisch gegen die Inkubationsdauer aufgetragen. **X** stand dabei für die nicht mit Silikat inokulierten Proben, **B** für Inkubationen mit Bytownit und **O** für Inkubationen mit Orthoklas.

nerpotenz geringer.

In den Peruproben konnte Methansäure und Ethansäure nachgewiesen werden. Die Ethansäurewerte stiegen über den gesamten Inkubationszeitraum an und erreichten Konzentrationen von bis zu 6 mM. Die Methansäurewerte stiegen ebenfalls, bei der Orthoklasinkubation von 1 µM auf 1,3 mM.

In den Mikrokosmen der Okinawainkubation konnte die größte Vielfalt an organischen Säuren

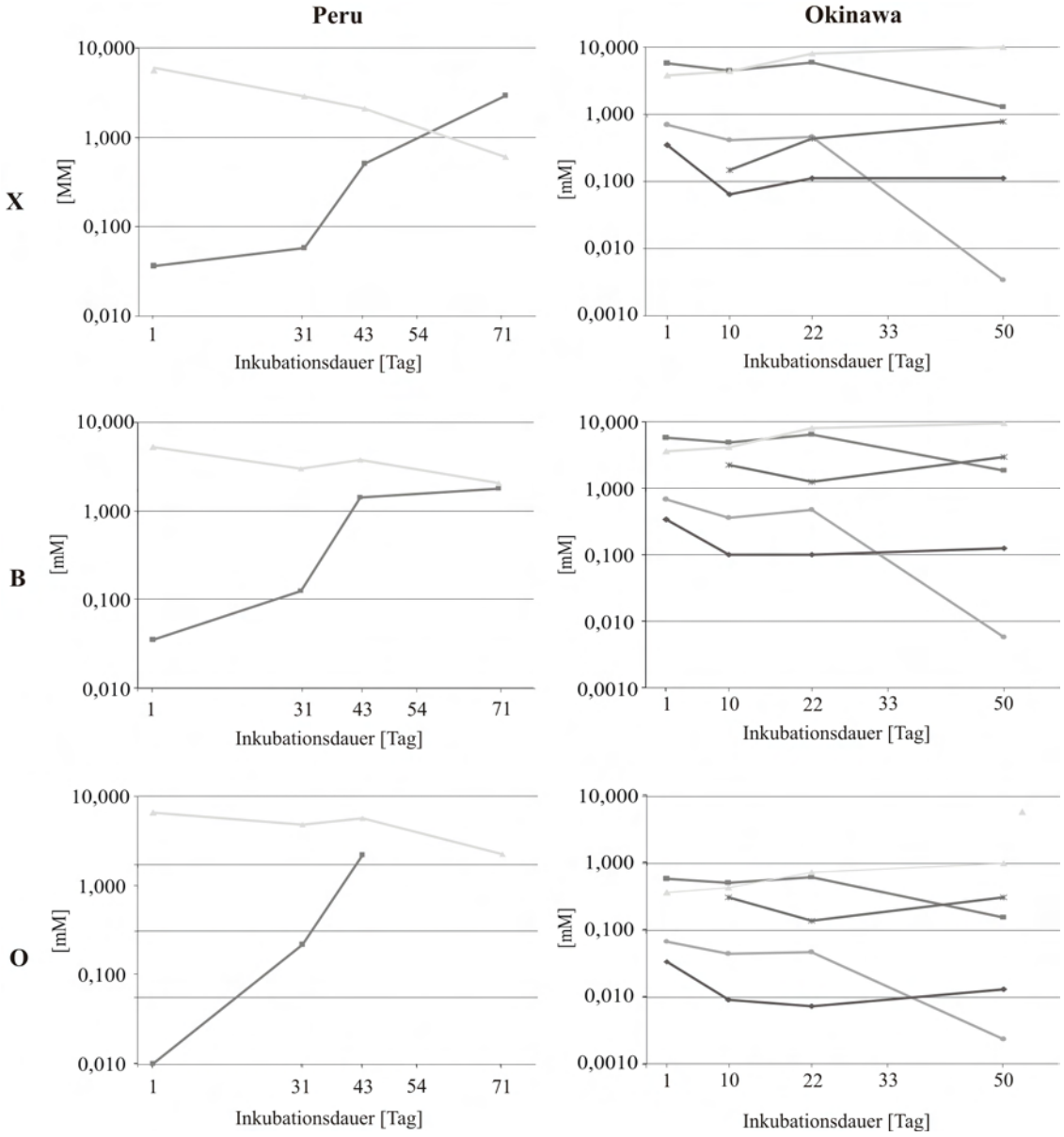

Abb. 5.8: Konzentration ausgewählter organischer Säuren in den Mikrokosmen mit Sakhalinsedimenten über den Inkubationszeitraum. Die molaren Konzentrationen von Methansäure (■, grau); Ethansäure (△, hellgrau); Succinylsäure (●, grau); Butansäure (∗, dunkelgrau) und Milchsäure (◇, grau) in den wurden logarithmisch gegen die Inkubationsdauer aufgetragen. **X** stand dabei für die nicht mit Silikat inokulierten Proben, **B** für Inkubationen mit Bytownit und **O** für Inkubationen mit Orthoklas.

detektiert werden. Die Succinylsäurekonzentration fiel im Verlauf der Inkubation von den hohen Ausgangswerten (bis zu 700 µM) auf 100 µM ab. Milchsäurekonzentrationen stagnierten bei einem Wert von etwa 100 µM. Die Methansäurekonzentration erreichte über weite Teile der Inkubation 4-5 mM, fiel zum Ende der Inkubation hin leicht ab. Ethansäure akkumulierte über den gesamten Zeitraum und erreichte in allen Inkubationen Maximalwerte von 9-10 mM.

5.2.3 Elementanalysen

Werte für die Elementanalyse wurden sowohl für den Start der Inkubation in den Mikrokosmen, als auch für das Ende der Selbigen ermittelt. Die Werte unterlagen dabei einer starken mathematischen Korrektur, da während des Inkubationszeitraums Unterproben entnommen und deren Volumen mit frischem Medium aufgefüllt wurde.

Mn Die Änderung der Mangankonzentration zeigte Unterschiede zwischen den Medien, während die Sedimente eines Habitats innerhalb der gleichen Medien meist ähnlich reagierten [Abb. 5.9]. Mn wurde tendenziell in geringen Mengen freigesetzt. Dabei war die stärkste Freisetzung mit bis zu 3,2 mg/ l bei Proben aus dem Sulfatreduzierersediment aus dem Sakhalin Trog sowohl in den Inkubationen mit Methanogenen- als auch mit Fermetierermedium zu messen. Ausgenommen von dem generellen Trend zur Mn-Freisetzung waren die Mikrokosmen mit Okinawasediment und Sulfatreduzierer- bzw. Fermentierermedium. Während im Sulfatreduzierermedium eine Mn-Freisetzung von etwa 1 mg/ l zu detektieren war, konnte im Fermentierermedium eine sehr schwache Senke mit Werten von 0,5 mg/l gemessen werden.

Fe Die Eisenkonzentrationen zeigten ein variables Verhalten [Abb. 5.9]. In Eisenreduzierer- und Fermentierermedium wurde Fe tendenziell eher sequestriert. Die Werte reichten dabei bis zu 49,7 mg/ l wie im Fall der Inkubation von Sakhalinsediment aus der metahnogenen Zone ohne Zugabe von Silikat. Eine entgegengesetzte Entwicklung konnte in dem Methanogenenmedium gemessen werden. Dort setzte ebenfalls das Sakhalinsediment aus der methanogenen Zone 33,8 mg/ l Fe frei. Die stärkste Eisenfreisetzung erfolgte im Sulfatreduzierermedium. Hier wurde ein Anstieg in der Fe-Konzentration von maximal 90 mg/ l Eisen in den Mikrokosmen des Sakhalinsediments aus der methanogenen Zone gemessen. Die gemessenen Eisenwerte, sowohl in dem Sulfatreduzierer-, als auch in dem Methanogenenmedium, zeigten keinen einheitlichen Trend . In beiden Medien unterschieden sich selbst Inkubationen des gleichen Sediments. So konnte das nicht inokulierte Sakhalinsediment der Sulfatreduziererzone 26 mg/ l Fe sequestrieren, wohingegen bei Inkubation mit Orthoklas eine Freisetzung von 13 mg/ l Fe gemessen wurde. Die so ermittelten Eisenwerte wurden in der flüssigen Phase gemessen. Sie ergänzen somit die Eisenwerte, die mittels HCl-Extraktion und Ferrozin aus dem Sediment gewonnen wurden.

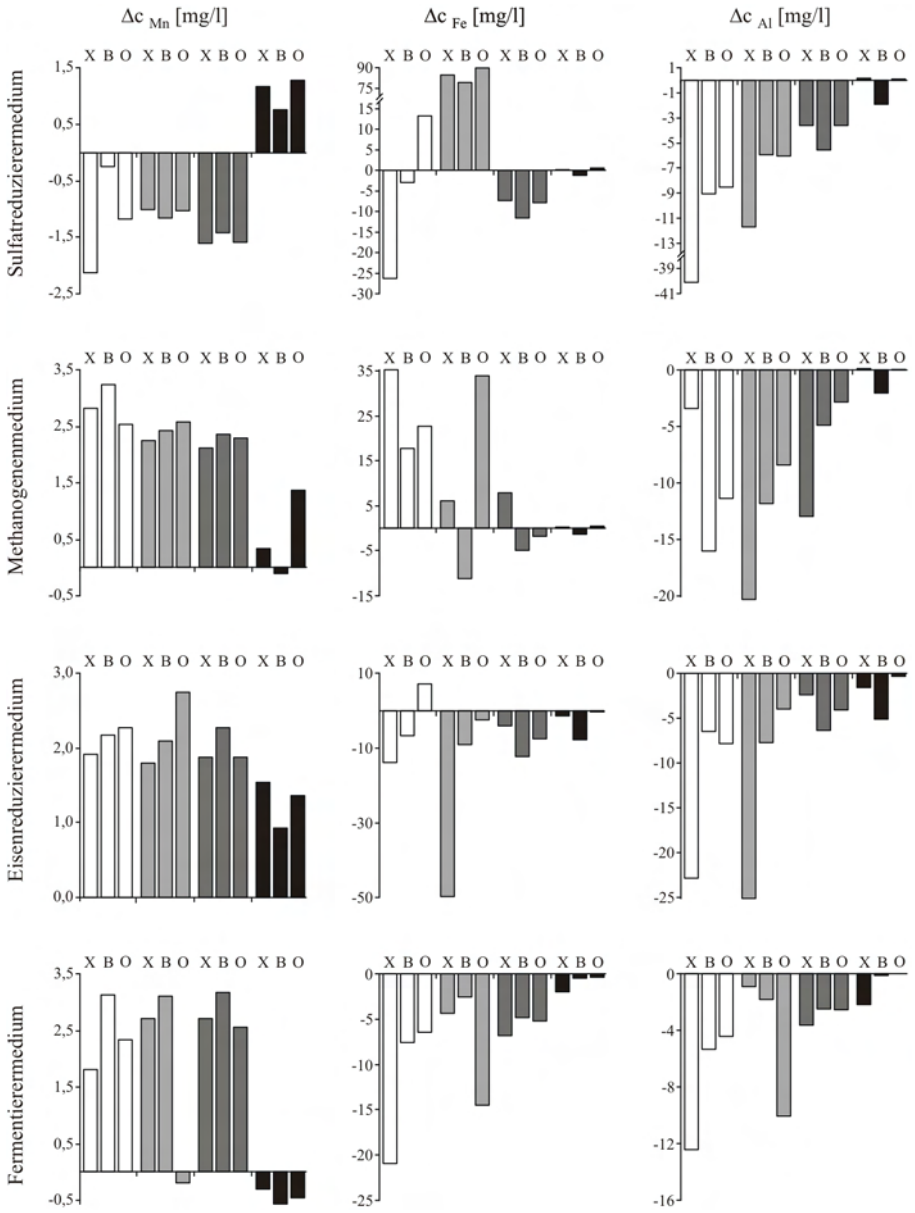

Abb. 5.9: Konzentrationsänderung von Mn, Fe, Al über den gesamten Inkubationszeitraum. Die Habitate werden farblich, durch X (Sedimentkontrolle), B (Bytownit) und O (Orthoklas) werden die Inokula beschrieben. **weiß** Sakhalin, Sulfatreduziererzone; **hellgrau:** Sakhalin, Methanogenenzone; **dunkelgrau:** Peru; **schwarz:** Okinawa.

Al Die Aluminiumwerte fielen in fast allen Proben. In den Proben aus Okinawa war dieser Wert am geringsten, teilweise wurden minimale Mengen im Bereich von 0,004 bis 0,1 mg/ l Al freigesetzt [Abb. 5.9]. In den Proben aus Sakhalin war diese Senke am Größten, dort traten Differenzen von bis zu Δc =- 40 mg/l auf. Die Sequestrierung erfolgte hauptsächlich im Methanogenenmedium, hier sank die Konzentration an Al pro Sediment im Schnitt 10 mg/ l.

K Die stärkste Kaliumsenke konnte im Sulfatreduzierermedium detektiert werden. Dabei wurden je nach Sediment zwischen 50 und 300 mg/l gebunden. Die Senke war in den drei anderen Medien

mit 20 bis 50 mg/ l geringer. Die Konzentrationsentwicklung im Okinawasediment war auffällig. Während die stärkste Senke aus dem Okinawasediment im Methanogenenmedium mit über 100 mg/l über den gesamten Inkubationszeitraum erfolgte, wurde in allen drei anderen Medien Kalium freigesetzt. Die Größenordnung von 20 bis 120 mg/ l war dabei spiegelbildlich zu den Sedimenten der anderen Habitate.

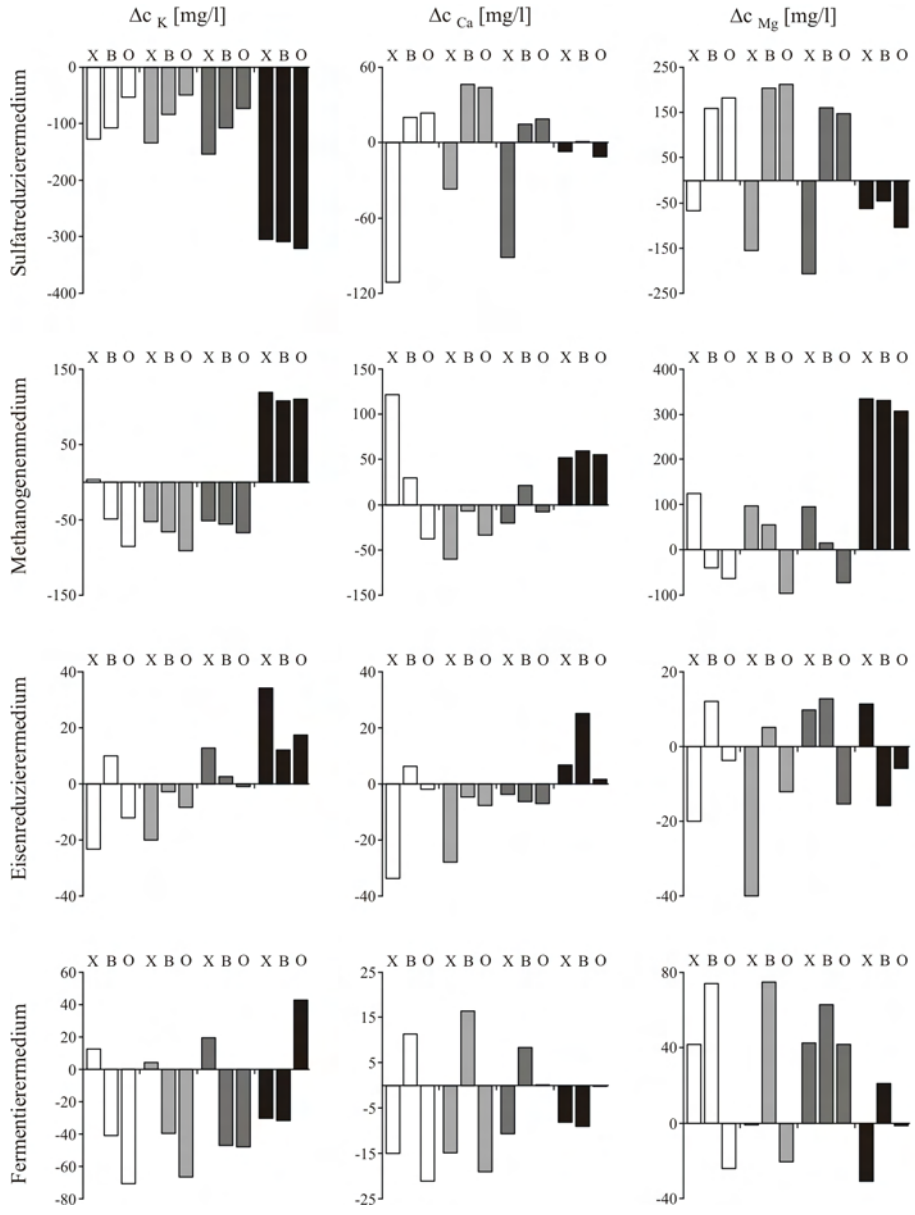

Abb. 5.10: Konzentrationsänderung von K, Ca und Mgl über den gesamten Inkubationszeitraum. Die Habitate werden farblich, durch X (Sedimentkontrolle), B (Bytownit) und O (Orthoklas) werden die Inokula beschrieben. **weiß** Sakhalin, Sulfatreduziererzone; **hellgrau:** Sakhalin, Methanogenenzone; **dunkelgrau:** Peru; **schwarz:** Okinawa.

Ca Die Entwicklung der Kalzium-Konzentration zeigte keinen eindeutigen Trend. Während im Sulfatreduzierermedium alle nicht inokulierten Proben Ca zu binden vermochten, setzen fast alle anderen Inkubationen Ca frei. Ausgenommen war hiervon die Okinawaprobe, in der es nur minimale Veränderungen gab. In den anderen Medieninkubationen zeigte sich auch innerhalb der gleichen Sedimente ein inhomogenes Bild. Die höchste Freisetzung erfolgte mit 121,6 mg/ l bei den in Methanogenenmedium inkubierten Sakhalinproben der Sulfatreduziererzone. Mit 91,8 mg/ l wurde die größte Ca-Senke bei peruanischem Sediment in Sulfatreduzierermedium gemessen.
Mg Magnesium unterlag in den Messungen erheblichen Schwankungen. Die meisten Proben zeigten tendenziell eine Freisetzung, von der 75% der mit Orthoklas inkubierten Proben ausgenommen waren. Die stärkste Freisetzung mit 334 mg/ l wurde in den mit Methanogenenmedium inkubierten Okinawasediment gemessen. Die schwächsten Veränderungen der Werte erfolgten im Eisenreduzierermedium mit Konzentrationsänderungen im Bereich von 20 mg/ l.

5.3 DNA Isolierung

Für die vorliegende Diplomarbeit wurden aus den Sedimenten des Sakhalin Trogs (Sulfatreduziererzone (SR) und Methanogenenzone(MG)) und Perus rDNA isoliert und sequenziert. Die so gewonnen Einblicke in die Biodiversität der Sedimente sollte eine Einschränkung der an mikrobieller Silikatverwitterung beteiligter Mikroorganismen ermöglichen. Nach der Isolierung der rDNA wurde diese qualitativ und quantitativ vermessen. Die Werte bestätigten, dass die Isolierung technisch erfolgreich war und ausreichende DNA-Konzentrationen für die Ligation und Transformation zur Verfügung standen. Die quantitativen Analysen der isolierten rDNA ergab für die per modifizierter, direkter Lyse isolierte rDNA Konzentrationen von maximal 110 ng/ µl, für das *FastDNA Spin Kit for soil* von MP 14 ng/ µl und für *soilDNA Kit* der Firma Omega Bio-Tek 8 ng/ µl. Über den Quotienten der Absorptionswellenlänge $A_{(260/280)}$ konnte die Reinheit der isolierten DNA bestimmen. Dabei wurden für die Isolate nach dem Protokoll der modifizierten, direkten Lyse Werte von 1,63, bei dem kommerziellen Kit von MP bei 1,5 und bei dem Kit der Firma Omega bei 1,8 gemessen.

5.3.1 16S rDNA-PCR

Die isolierte rDNA, sowie eine 1:10 Verdünnung derselbigen wurden als Template für eine 16S rDNA-PCR eingesetzt. Es wurde durch Bandenstärke und Spur deutlich [Abb. 5.11], dass die Ausbeute für bakterielle Proben mit dem Extraktionskit von MP am Höchsten war, für archaeelle

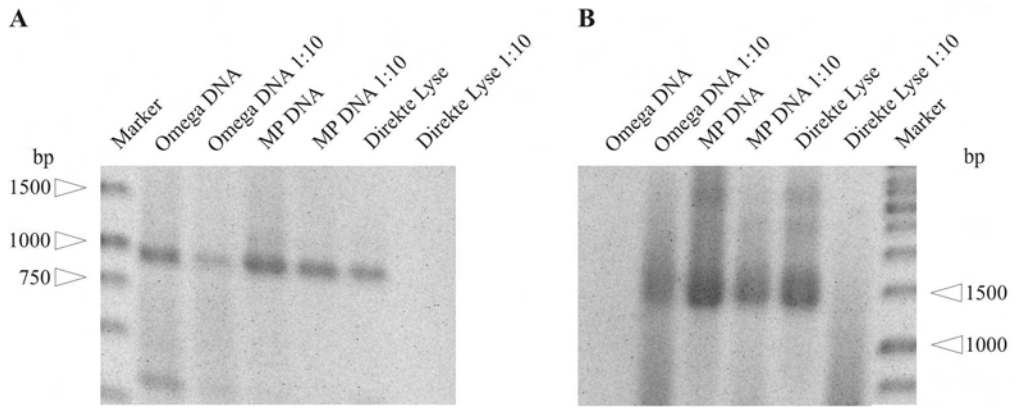

Abb. 5.11: Vergleich der Kits für DNA Isolierung nach erster PCR. Marker Gene ruler, die wichtigsten Banden wurden mit der Größe der Fragmente in Basenpaaren (bp) beschriftet . **A** Archaeen, **B** Bakterien. Die Probenspuren wurden entsprechend des gewählten Kits beschriftet. Die Darstellung des Gels erfolgte im invertierten Modus der Grauwerte.

Proben die direkte Lyse die besten Ergebnisse erzielte. Auf Basis dieser Testergebnisse wurde die Isolierung der DNA aus den Zielsedimenten aufgeteilt. Bakterielle DNA wurde per direkter Lyse isoliert, archaeelle DNA per kommerziellem Kit von MP. Nach der Aufreinigung der Proben und 16S rDNA-PCR mit spezifischen Primern wurden die Amplifikate gelelektrophoretisch analysiert [Abb. 5.12]. Archaeelle Banden liefen auf Höhe von 900 bp, bakterielle Banden auf Höhe

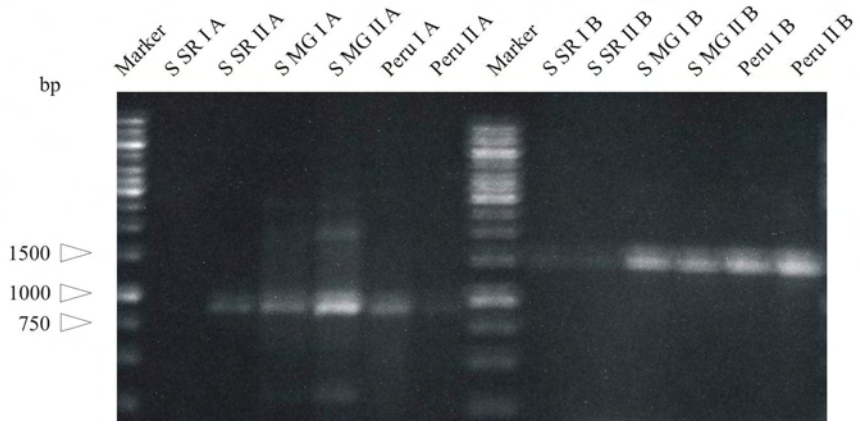

Abb. 5.12: Testgel nach der ersten 16S-PCR. Marker: Top Vision, die wichtigsten Banden wurden beschriftet. Die Habitate aus denen die Isolate stammen werden mit S SR (Sakhalin Sulfatreduzierende Region), S MG (Sakhalin methanogene Zone) und Peru (Peru) abgekürzt. Der nachgestellte Buchstabe **A** Archaeen; **B** Bakterien.

von 1400 bp. Die Isolierungen aus der Sulfatreduziererregion (SR) des Sakhalin Trogs war relativ schwach, alle anderen Banden zu erkennen. Die Aufreinigung erfolgte aus dem Agarosegel und die Eluate wurden photometrisch per NanoDrop vermessen. Es wurden DNA-Konzentrationen von 1,48 ng/ µl (Peru, Archaeen) bis 4,44 ng/ µl (Sakhalin methanogene Zone, Archaeen) isoliert. Die aufgereinigten Eluate wurden in einen TOPO pCRII Vektor kloniert und per Hitzeschock in

DH5α Zellen transformiert. Die Kolonie-PCR, nach einem zweimaligen Ausplattieren der positiven Klone, zeigte ausreichend positive Klone, die in der Sequenzierung Verwendung fanden.

5.3.2 18S-rDNA-PCR

Um den Einfluss von eukaryotischen Organismen auszuschließen, wurde in unterschiedlicher Probenverdünnung ein PCR-Screening durchgeführt. Für die PCR mit den EukA-Primern wurden die Proben nach der modifizierten, direkten Lyse verwendet, weil in diese eine höhere DNA-Konzentration und -Reinheit zeigten.

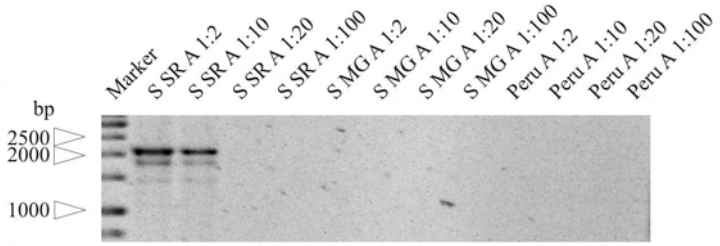

Abb. 5.13: 18S PCR Ergebnisse. Marker: Top Vision, die wichtigsten Banden wurden beschriftet. Proben der drei Habitate (S SR (Sakhalin Sulfatreduzierende Region), S MG (Sakhalin methanogene Zone) und Peru (Peru)) wurden in vier Verdünnungen mit dem Primer EukA versetzt, amplifiziert und in einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt.

Die PCR Produkte der beiden positiven Banden SR B 1:2, sowie SR B 1:10 wurden über ein Agarosegel aufgereinigt und per NanoDrop vermessen:

Tab. 5.1: Nano Drop Ergebnisse der Gelelution 18S. Gemessen wurden die Konzentration in ng/µl und die Reinheit der Probe über den Quotienten der Absorptioswellenlängen von DNA und Protein.

Probe	Konzentration [ng/µl]	A_{260}/A_{280}
S SR B 1:2	10,23	1,83
S SR B 1:10	2,63	4,01

Nach der PCR folgte die Klonierung in den TOPO pCRII Vektor, die Transformation in die DH5α-Zellen und die Kolonie-PCR. Im letzten Schritt wurden die Proben mit den EukA fwd. Primern sequenziet.

5.3.3 Mikrobielle Diversität

Nach der Sequenzierung konnten 157 16S rRNA-Gene analysiert und mittels ARB phylogenetisch zugeordnet werden. Die folgenden Ergebnisse wurden entsprechend er analysierten Domänen unterschieden.

Archaeen

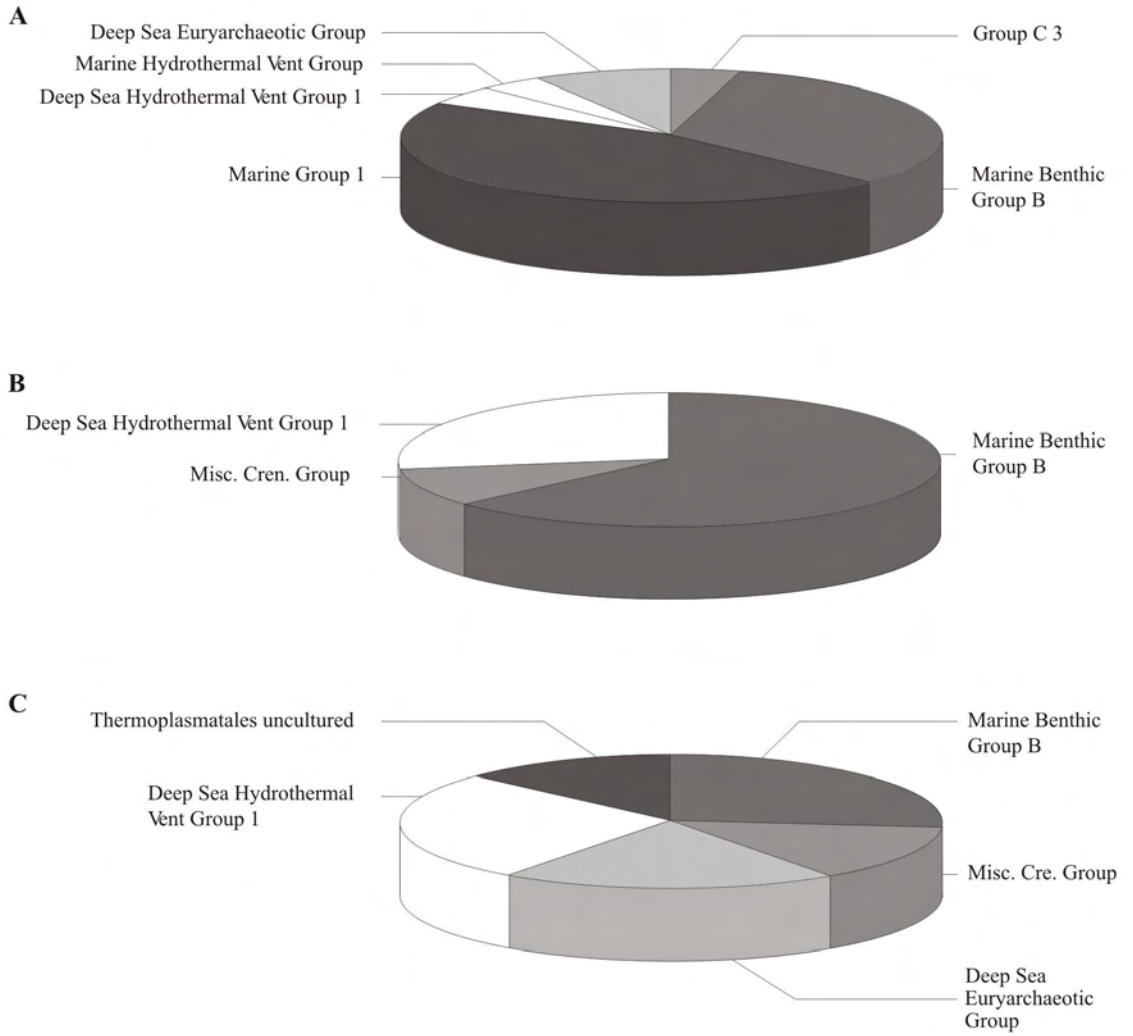

Abb. 5.14: Ergebnisse der phylogenetischen Analysen. Der Abbildung können die Ergebnisse der phylogenetischen Analysen für archaeelle Proben entnommen werden. Dabei wurde jedem analysierten Sediment ein Abbildungsteil zugeordnet **A** Sulfatreduziererzone des Sakhalin Trogs, **B** Methanogenenzone des Sakhalin Trogs **C** Peru.

Fast 50% der archaeellen Sequenzen des Sakhalinsediments aus der Sulfatreduziererzone konnten der *Marine Group I* zugeordnet werden, sie machten elf der 24 Sequenzen aus. Der zweitgrößte Anteil mit 30% entfiel auf Mitglieder der *Marine Benthic Group B* [Abb. 5.14 A]. Mitglieder der *Marine Benthic Group B* stellten in dem tiefer liegenden Sediment der methanogenen Zone fast 60% aller mit der Sequenzierung erfassten Organismen. Weitere 27% entfielen auf Mitglieder der *Deep Sea Hydrothermal Vent Group (DSHVG)* [Abb. 5.14 B]. Die archaeellen Sequenzen in dem peruanischen Sediment zeigten eine relativ gleichmäßige Aufteilung zwischen *DSVHG*, *Marine Benthic Group B* und *Deep Sea Euryarcheotic Group* Mitgliedern [Abb. 5.14 C]. Die Sequenzierungsergebnisse für 18S rDNA zeigen eine relativ geringe Diversität. 74% der Treffer entfielen auf

Paradinium sp., 26% waren bisher unkultivierte Klone aus marinen Umweltproben.

Bakterien

Sequenzierungen der Sedimente aus Sakhalin zeigten in beiden Fällen eine Dominanz der γ-Proteobakterien, mit Unterschieden in der phylogenetischen Zusammensetzung. Während in der Sulfatreduziererzone *Shewanella* und *Pseudoalteromonas* vorherrschten [Abb. 5.15 A], fanden sich in dem tiefer liegenden, potentiell methanogenem Sediment hauptsächlich *Halomonas* [Abb. 5.15 B]. Das peruanische Sediment zeigte sich mikrobiell am vielfältigsten. Neben γ-Proteobakterien waren hier auch δ-Proteobakterien, beide mit etwa 30% an der Gesamtzahl der Sequenzen beteiligt. Auffällig ist der große Anteil funktionell verwandter Bakterien aus der Gruppe der Sulfatreduzierer [Abb. 5.15 C].

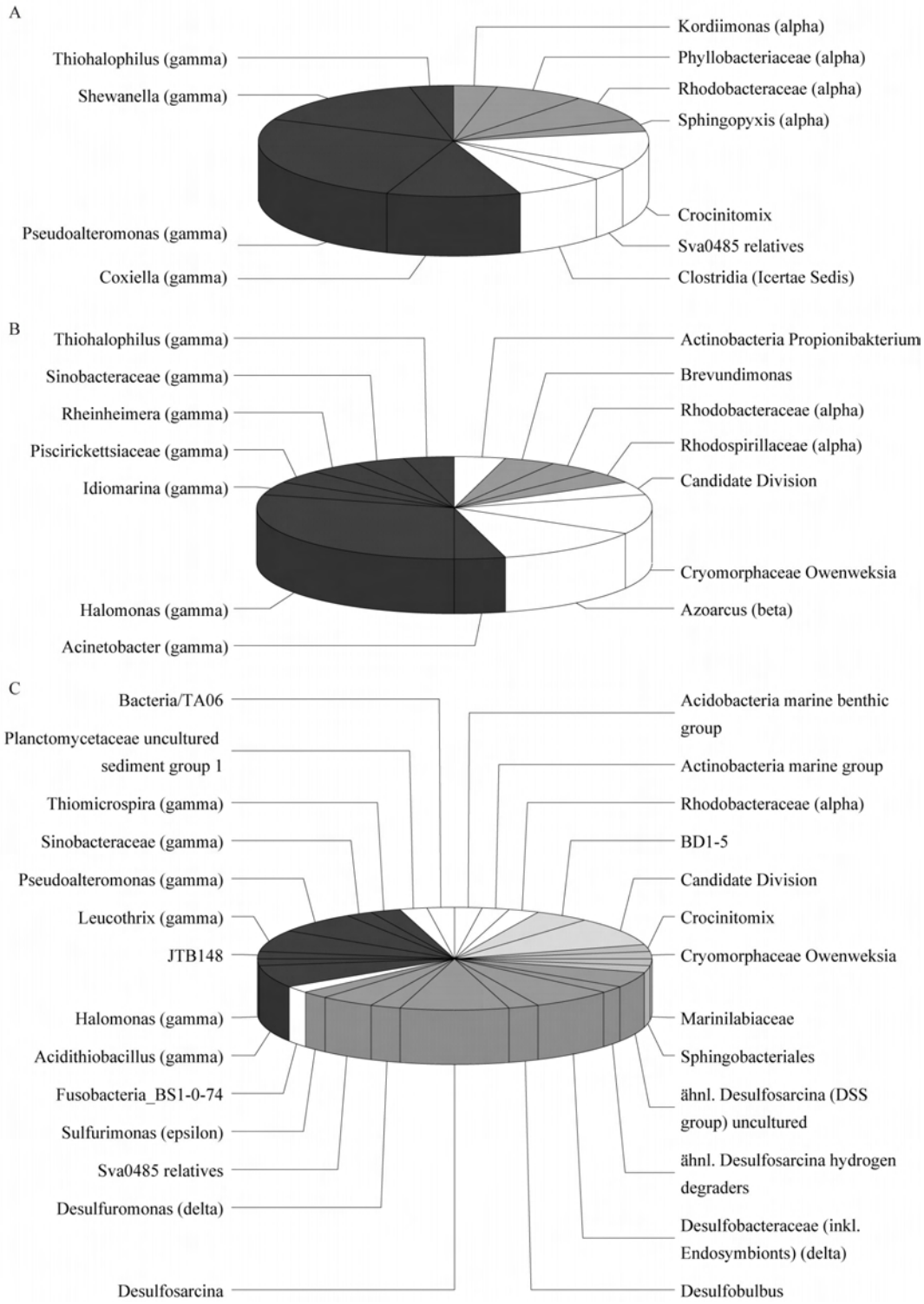

Abb. 5.15: Ergebnisse der phylogenetischen Analysen. Der Abbildung können die Ergebnisse der phylogenetischen Analysen für bakterielle Proben entnommen werden. Dabei wurde jedem analysierten Sediment ein Abbildungsteil zugeordnet **A** Sulfatreduziererzone des Sakhalin Trogs, **B** Methanogenenzone des Sakhalin Trogs **C** Peru.

5.4 CARD-FISH

Für die CARD-FISH-Analyse fanden Silikate aus allen Habitaten, die mit dem Eisenreduziererermedium inkubiert worden waren, Verwendung. Die Markierung erfolgte mit einer Sonde für Bakterien und einer speziellen Sonde für *Shewanella putrefaciens*. Zusätzlich wurden die Proben mit DAPI angefärbt. Die Analysen erfolgten sowohl mit einem Epifluoreszenzmikroskop, als auch mit Hilfe eines konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops (CLSM). Die nachfolgenden Abbildungen zeigen den gleichen Bildausschnitt mit den Filtern zum Nachweis von DAPI, Alexa488 und Alexa546, sowie die nachträgliche Überlagerung der Bilder.

Das optimalste Detektionsergebnisse konnte mit der Probe aus dem Okinawa Trog, die mit dem Silikat Bytownit inkubiert wurde, erzielt werden. Hier waren stäbchenförmige Bakterien zu erkennen, die Signale in allen drei Bildern ergaben. Die Zusammenführung der Bilder bestätigte eine exakte Überlappung der Signale [Abb. 5.16]. Die Bindung der Sonden und Farbstoffe konnte jedoch nur in diesem Fall so spezifisch zugeordnet werden. Die unspezifischen Bindungen sind besonders gut in [Abb. 5.17] zu erkennen. Aus [Abb. 5.17 **A** und **B**] geht hervor, dass auch flächendeckende Strukturen markiert wurden. Darin eventuell befindliche Einzelsignale von Bakterien sind nicht mit absoluter Sicherheit extrahierbar. Im oberen rechten Quadranten der Bilder ist eine diagonal verlaufende Kristalllinie mit angefärbt. Ein weiteres Problem wurde in den Bildern **C** und **D** der gleichen Abbildung deutlich. Hier zeigten potentiell positive Signale des CARD-FISH-Protokolls, keine bzw. nur sehr schwache Entsprechungen in der DAPI-Färbung. Sowohl Größe als auch Form der Fluoreszenzsignale würden für Signale bakteriellen Ursprungs sprechen. Eine zweifelsfreie Zuordnung ist jedoch nicht möglich. Im Hintergrund sind für Umweltproben typische falsch-positive flächige schwächere Signale zu erkennen. Die in [Abb. 5.18] dokumentierten Signale zeigten die bereits erwähnte unspezifischen Bindungsverhalten deutlich. Während in den Bildteilen **A-C** Signale aller drei Farbstoffe auftreten, zeigte die Übereinanderlegung mit dem Reflektionsbild, dass hier auch prominente topographische Eigenschaften des Kristalls angefärbt wurden. Diese Ergebnisse wurden durch [Abb. 5.19] unterstützt.

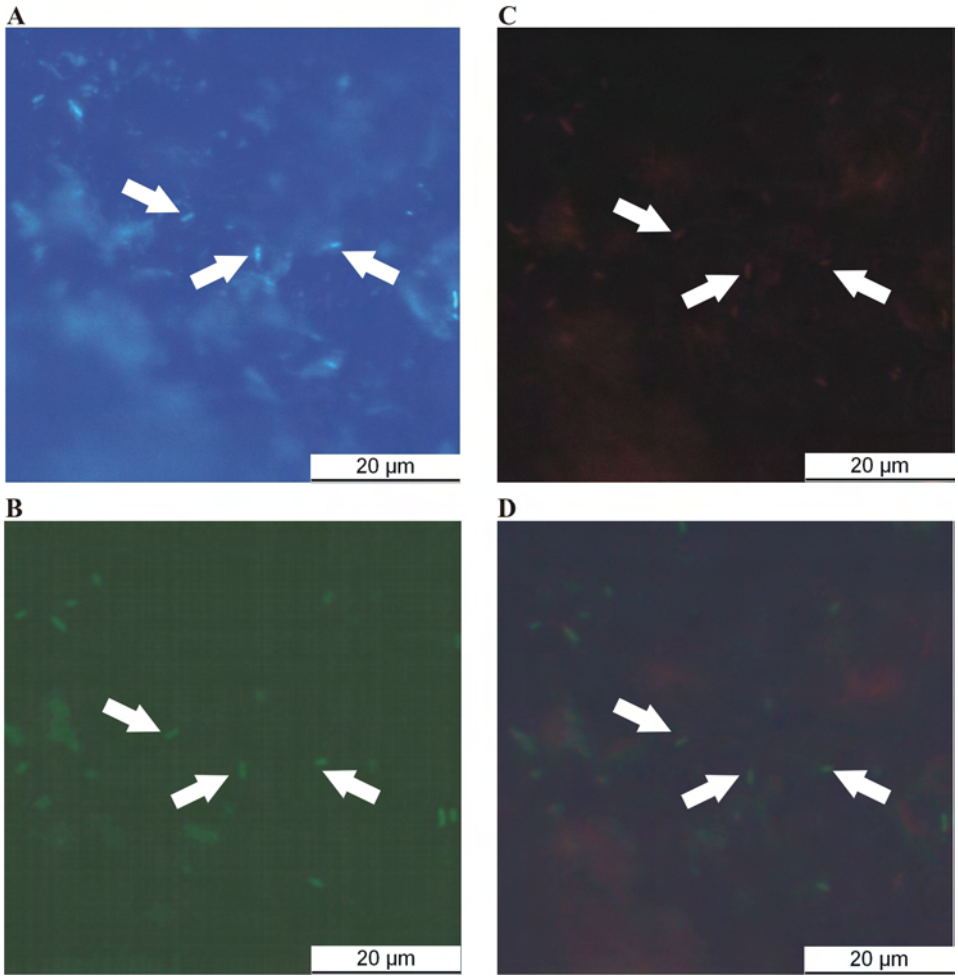

Abb. 5.16: Epifluoreszenzbilder Bytownit in Okinawa inkubiert. Positive Signale mit allen drei Markierungen wurden exemplarisch mit Pfeilen markiert. **A** DAPI-Färbung; **B** Alexa488 und Eu-Bakteria-Sonde; **C** Alexa546 und Shewanella Sonde; **D** Übereinandergelegte Bilder A bis C.

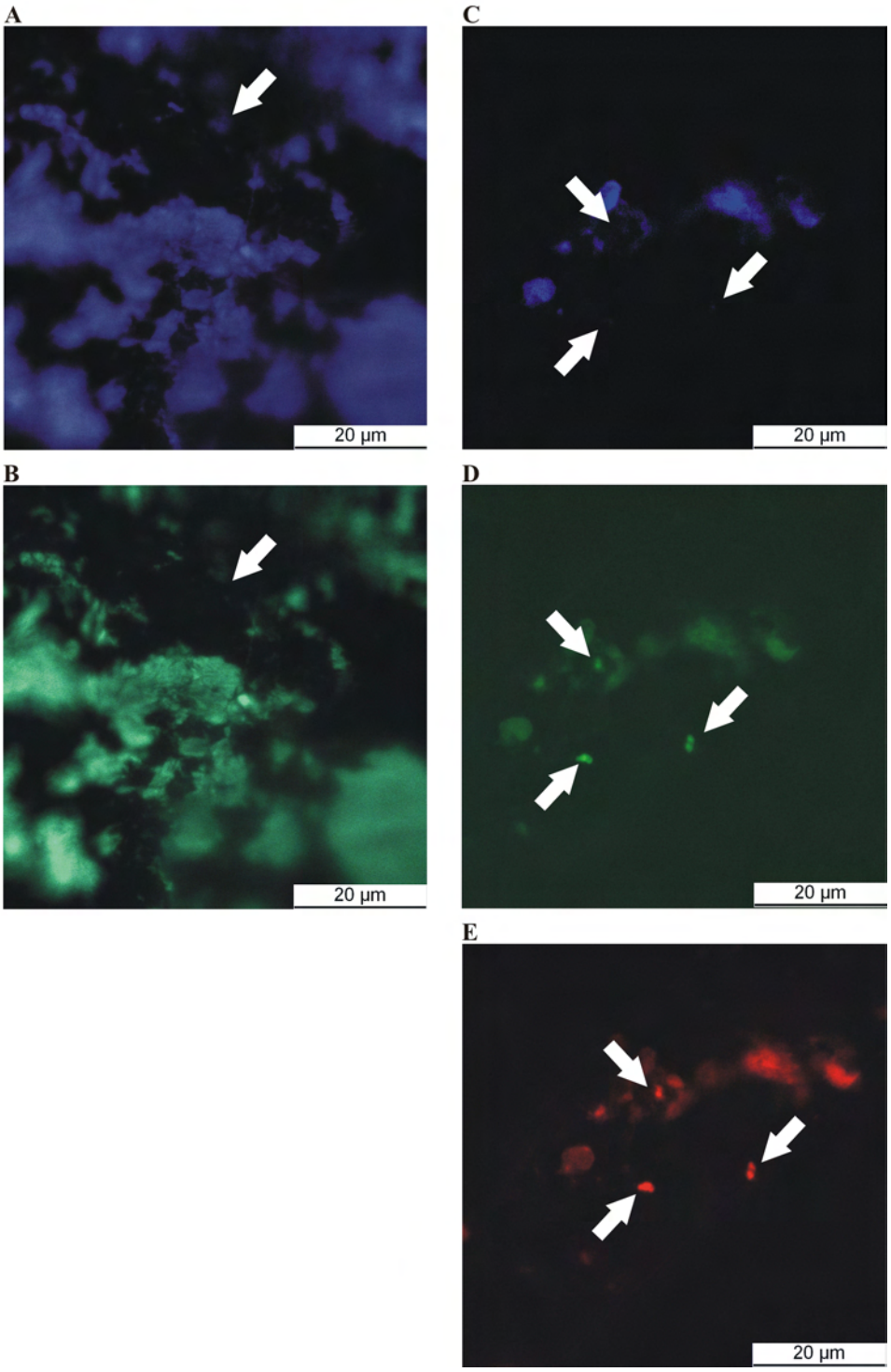

Abb. 5.17: Epifluoreszenzbilder Bytownit (A und B) und Orthoklas (C bis E) in Peru inkubiert. **A** DAPI-Färbung; **B** Alexa488 und Eu-Bakteria-Sonde; **C** DAPI-Färbung; **D** Alexa488 und Eu-Bakteria-Sonde; **E** Alexa 546 und *Shewanella sp.* Sonde. **A und B** Die Fluoreszenzsignale machten Kristallkanten (Pfeile) und flächige Strukturen sichtbar. **C bis E** Fluoreszenzsignale von potentiellen Mikroorganismen (Pfeile) die DAPI-Färbung war sehr undeutlich.

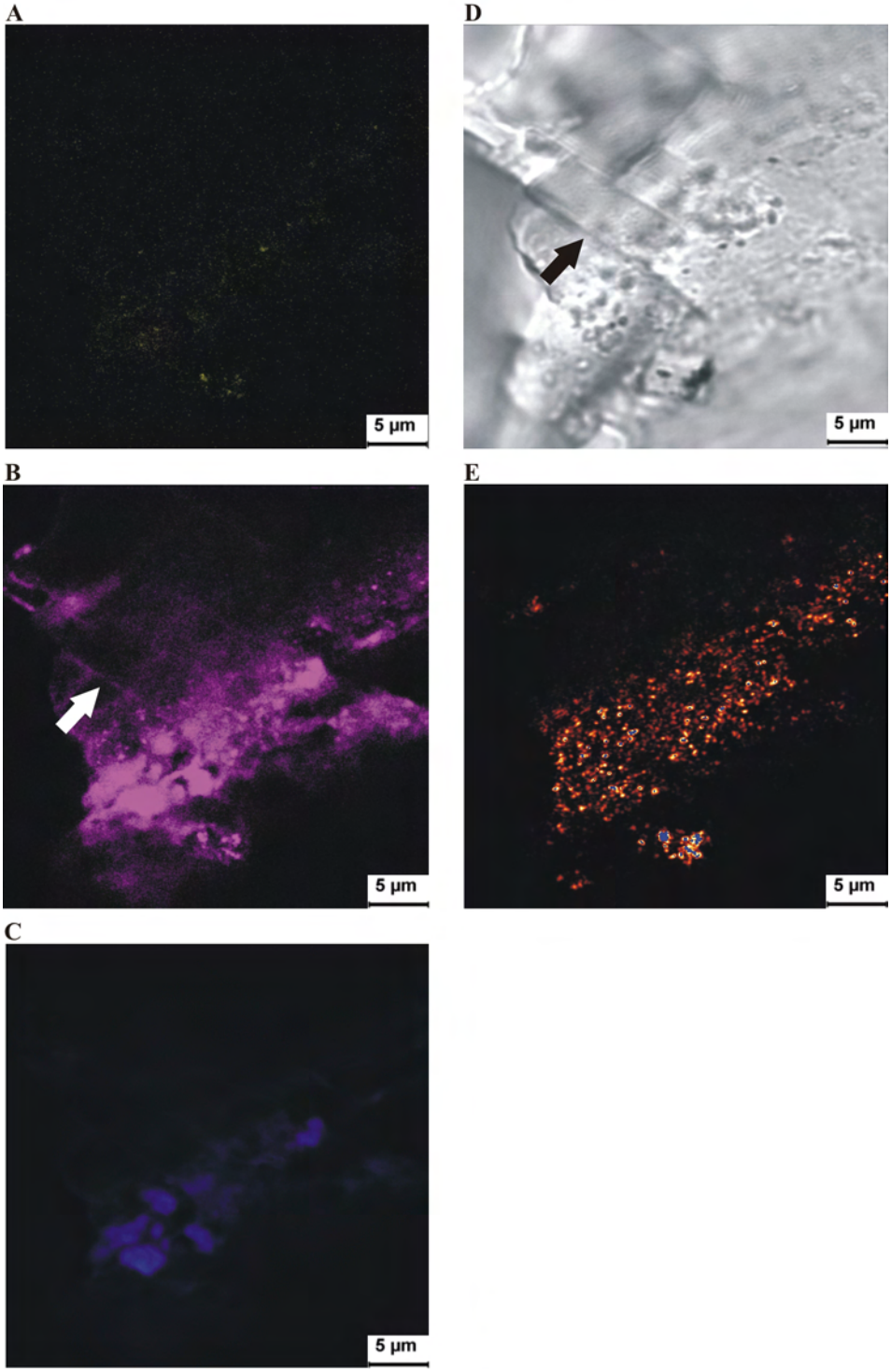

Abb. 5.18: Epifluoreszenzbilder Bytownit in Peru inkubiert. A Alexa488 und Eu-Bakteria-Sonde **B** Alexa 546 und *Shewanella sp.* Sonde; **C** DAPI-Färbung; **D** Reflektionsbild; **E** Übereinandergelegte Bilder A bis D. **B** falsch-positives Signal an einem markanten Kristallbruch (Pfeil); **D** Topographie des Kristalls mit markantem Kristallbruch (Pfeil).

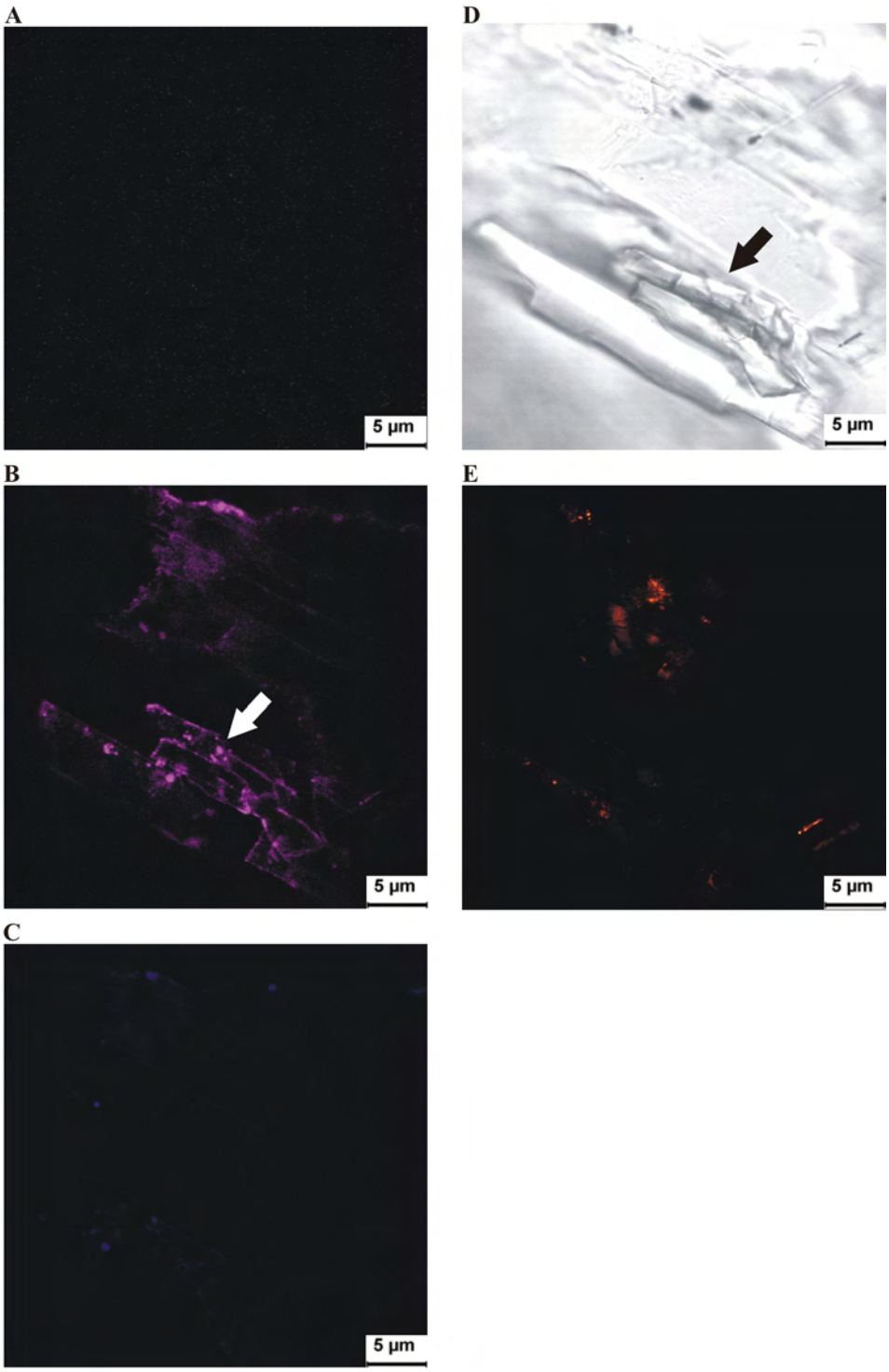

Abb. 5.19: Epifluoreszenzbilder Bytownit in Peru inkubiert **A** Alexa488 und Eu-Bakteria-Sonde **B** Alexa 546 und Shewanella sp. Sonde **C** DAPI-Färbung; **D** Reflektionsbild; **D** Übereinandergelegte Bilder A bis D. **B** falsch-positives Signal an einem markanten Kristallbruch (Pfeil); **D** Topographie des Kristalls mit markantem Kristallbruch (Pfeil).

5.5 REM

Die Mikroskopie der inkubierten Kristalle erfolgte in zwei Abschnitten. Zunächst wurden Kristalle analysiert die in peruanischem Sediment inkubiert worden waren. Die mikrobielle Aktivität in dem peruanischen Sediment war im Vergleich der vier Sedimente am höchsten und versprach somit möglichst ideale Voraussetzungen für Silikatverwitterung. Für die Rasterelektronenmikroskopie wurden aus jedem mit Silikat inokulierten peruanischen Mikrokosmos (sedimentfreie Kontrollen und Sedimentinkubationen) Kristalle entnommen. Die Kristalle wurden nach der Entnahme entweder mit EtOH oder Karnovskyreagenz fixiert. Alle im Folgenden dargestellten Bilder mit einem 50 µm Maßbalken wurden mit einer 200fachen Vergrößerung aufgenommen, 5 µm Maßbalken zeigen eine 2000fache Vergrößerung an. Als Referenz für nicht verwitterte Silikate wurden Aufnahmen von nicht inokulierten Kristallen gezeigt, die vor der Mikroskopie nur mit EtOH behandelt wurden [Abb. 5.20 Bildteil A bis D]. Bei beiden Kristallen (Bytownit und Orthoklas) waren die Kristalloberflächen unverletzt und lediglich mit Kristallbruchstücken übersät. Die kleinen Bruchstücke waren symmetrisch und zeigten gerade Bruchkanten. Die Bruchstücke waren das Resultat der mechanischen Zerkleinerung der für die Inkubation zu großen Ausgangssilikate.
Als weitere Referenz wurden zwei Medienkontrollen verglichen. Um Verwitterungseffekte durch den unterschiedlichen pH Wert der Medien auszuschließen wurden Kristalloberflächen von Bytownit verglichen der sedimentfrei entweder in Fermentierermedium [Abb. 5.20 Bildteil E und F] oder in dem saureren Okinawa-Fermentierermedium [Abb. 5.20 Bildteil G und H] inkubiert worden war. Die morphologischen Beschaffenheiten der Kristalle aus den zwei Medien (Standardmedium und Okinawamedium) unterschieden sich nicht. Eine Übersicht über die Vergleiche in allen Medien kann der [Abb. 5.21] entnommen werden. Alle Bilder zeigten gerade Kristallkanten, muschelige Brüche und plane Oberflächen. Die Strukturen waren geometrisch und regelmäßig. Diese morphologischen Merkmale wurden als Referenz für die Beschreibung von Verwitterungserscheinungen verwendet.

Silikatinkubationen in peruanischem Sediment

Die Oberflächen der in Sulfatreduzierermedium inkubierten Kristalle zeigten nur leichte Veränderungen [Abb. 5.22]. Es konnten auf dem in Sulfatreduzierermedium inkubierten Bytownitkristall Mikroorganismen in unmittelbarer Nähe zu amorphen noch unspezifizierten Agglomeraten nachgewiesen werden [Abb. 5.22 Bildteil C]. In der parallelen Orthoklasinkubation [Abb. 5.22 Bildteil D und E] konnten keine Bakterien nachgewiesen werden. Wie aus diesem Abbildungsteil ersicht-

lich, führte die protokollgemäße Besputterung der Proben allerdings zu relativ dicken Goldauflagerungen die feine Strukturen und Formen in einigen Fällen überdecken könnten. Im Vergleich zu den EtOH fixierten Kristallen wiesen die nach Karnovsky fixierten Oberflächenveränderungen auf [Abb. 5.23]. Auf den Bytownitproben waren flächige Strukturen zu erkennen, die sich bei größtmöglicher Vergrößerung als komplexe amorphe Auflagerungen darstellten [Abb. 5.23 Bildteil B und C]. Die Oberfläche des Orthoklas [Abb. 5.23 Bildteil D und E] war großflächiger verändert und zeigten größere Rauigkeit und strukturelle Veränderungen. Oberflächenveränderungen konnten in Methanogenenmedium sowohl für Bytownit als auch für Orthoklas dokumentiert werden [Abb. 5.24]. Die Oberfläche war teilweise aufgelöst und von stäbchen- oder kommaförmigen Mikroorganismen besiedelt [Abb. 5.24 Bildteil C]. Zusätzlich konnten auf den Kristall aufgelagerte amorphe strukturen dokumentiert werden, die sich in unmittlelbarer Nähe der fixierten Mikroorganismen befanden [Abb. 5.24 Bildteil F]. Die mit Karnovskyreagenz fixierten Kristalle vervollständigten das Bild aus dem Methanogenenmedium. Die in [Abb. 5.25] gezeigten Strukturen konnten hauptsächlich an Kristallkanten und Brüchen detektiert werden. Die bisher stärksten Veränderungen zusammen mit dem dichtesten Bakterienvorkommen zeigten sich auf Kristallen die mit peruanischem Sediment in Eisenreduzierermedium inkubiert wurden [Abb. 5.26]. Die Kristalloberflächen wiesen massive und großflächige Veränderungen in der morphologischen Struktur auf. Auf den amorphen Strukturen konnte eine dicht mikrobielle Besiedlung dokumentiert werden [Abb. 5.26 Bildteil F]. Ob diese Bakterien vor der Fixierung noch lebten, oder selbst kalzifiziert waren ist den Bilder nicht zu entnehmen. Die Oberflächen der mit Karnovskyreagenz fixierten Kristalle zeigten eine weitere Variante von Oberflächenveränderungen. Die Kristalloberflächen wurden während der Inkubation von Rissen durchzogen, so dass sich im Folgenden Stücke von dem Gesamtkristall ablösen konnten [Abb. 5.27 Bildteil B]. Bei den Inkubationen in Fermentierermedium konnte in einem besonders dicht besiedelten Bereich des Kristalls eine Kavität dokumentiert werden, deren Ränder, innere Wand und Umgebung von stäbchenförmigen Bakterien bedeckt war [Abb. 5.28 Bildteil C]. Die Umgebung der Kavität wies keinerlei ähnliche Vertiefungen auf, Reste des noch sichtbaren Kristalluntergrunds könnten ein Indiz dafür sein, dass es sich um ein mikrobielles Eindringen in tiefere Kristallebenen handelte. An den Rändern der Kavität fanden sich zudem amorphe nicht kristalline Strukturen wie sie bereits in größerem Umfang auch auf vorhergehenden Bildern gezeigt werden konnten. Der inkubierte Orthoklas zeigte ebenso stark veränderte Oberflächen, die von Bakterien besiedelt waren [Abb. 5.28 F]. Bei den in [Abb. 5.29] sichtbaren Strukturen konnte nicht genau gezeigt werden, ob es sich um Auflagerungen oder Veränderungen

des eigentlichen Kristalls handelte. Die auf dem Bytownitkristall dokumentierten Veränderungen zeigten eine amorphe Struktur, während auf dem Orthoklas räumlich dichtere Veränderungen auftraten. In direkter Umgebung befindliche Kristallkanten waren abgerundet, einzelne Stücke aus dem Kristall herausgebrochen.

Die Auswertung der Rasterelektronenmikroskopbilder des ersten Abschnitts ergaben keinen Unterschied zwischen den beiden Silikaten Bytownit und Orthoklas. Allerdings zeigte die EtOH Fixierung die besseren Ergebnisse. Auf Grund dieser Erkenntnisse wurde in einen zweiten Abschnitt nur Bytownitkristalle mikroskopiert die mit EtOH fixiert wurden. Die Kristalle stammten aus den Inkubationen mit Sedimenten aus der methanogenen Zone des Sakhalin Trogs und dem peruanischen Schelfs.

Silikatinkubationen in Sediment des Sakhalin Trogs, methanogene Zone

In allen vier verwendeten Medien zeigten sich Veränderungen an der Kristalloberfläche. Die Verwitterungseffekte waren weniger stark als in der vergleichbaren Inkubation von peruanischem Sediment, zeigten aber vergleichbare Muster. Der in Sulfatreduzierermedium inkubierte Kristall zeigte dabei Ausbrüche [Abb. 5.30 Bildteil A und E]. Es konnten keine Bakterien identifiziert werden, auch wenn sich z.B. im oberen linken Quadranten des Bildteils A potentielle Strukturen zeigten. Als Folge der Inkubation mit Sakhalin Met Sediment und Methanogenemmedium zeigen sich Materialverluste auf dem Bytownitkristall sowie vereinzelte amorphe Auflagerungen [Abb. 5.30 Bildteil B und F].

In den Übersichtsbildern der Inkubationen in Eisenreduzierer- bzw. Fermentierermedium [Abb. 5.30 Bildteil C und D] waren strukturelle Änderungen gegenüber den Referenzen sichtbar. Die Oberfläche der Kristalle wurde abgetragen und wiesen eine charakteristische Mikrotopographie auf. In der Detailansicht stellte sich Letztere als fächerartige Struktur dar, die dem ersten Eindruck nach Überreste des Kristalls darstellten. Aus der rissige Kristalloberfläche waren Teile des Kristalls herausgebrochen [Abb. 5.30 Bildteil G und H]. Die Brüche unterschieden sich von den muscheligen Brüchen in den Kontrollen [Abb. 5.20 Bildteil E und G].

Silikatinkubationen in Sediment des Okinawa Trogs

Die Oberflächen der mit Okinawa Sediment in Sulfatreduzierer- bzw. Methanogenenmedium inkubierten Kristalle zeigten nur schwache Verwitterungserscheinungen [Abb. 5.31]. Bei dem auffallend chaotischen Bereich in der oberen Bildhälfte von Bildteil B handelte es sich nicht um

Verwitterungsprodukte. Bei genauerer Kontrolle konnten hier Bruchstücke von Diatomen und diverse Kristallsplitter identifiziert werden. Wahrscheinlich handelte es sich um ein Artefakt der Sedimentinkubation das den Waschschritten widerstand. Wie aus Bildteil F ersichtlich, konnten auf dem Kristall trotzdem Oberflächenveränderungen detektiert werden. Die Effekte in den Eisenreduzierer- und Fermentermedium basierenden Inkubationen war auch bei dem Okinawasediment deutlicher als bei den vorherigen Medien [Abb. 5.31]. Hier zeigten sich starke Veränderungen der Kristalloberflächen. Wie aus Bildteil G ersichtlich, konnten hier sekundäre Strukturen gezeigt werden an die prismenförmige Kristalle gebunden zu sein schienen. Die Analyse der letzten Kristalle (Bildteile D und H) warf auf Grund der Gesamttopographie einige Probleme auf, was sich in geringerer Bildschärfe niederschlug. Es zeigten sich trotzdem unregelmäßige Auflagerungen auf die Kristalloberfläche.

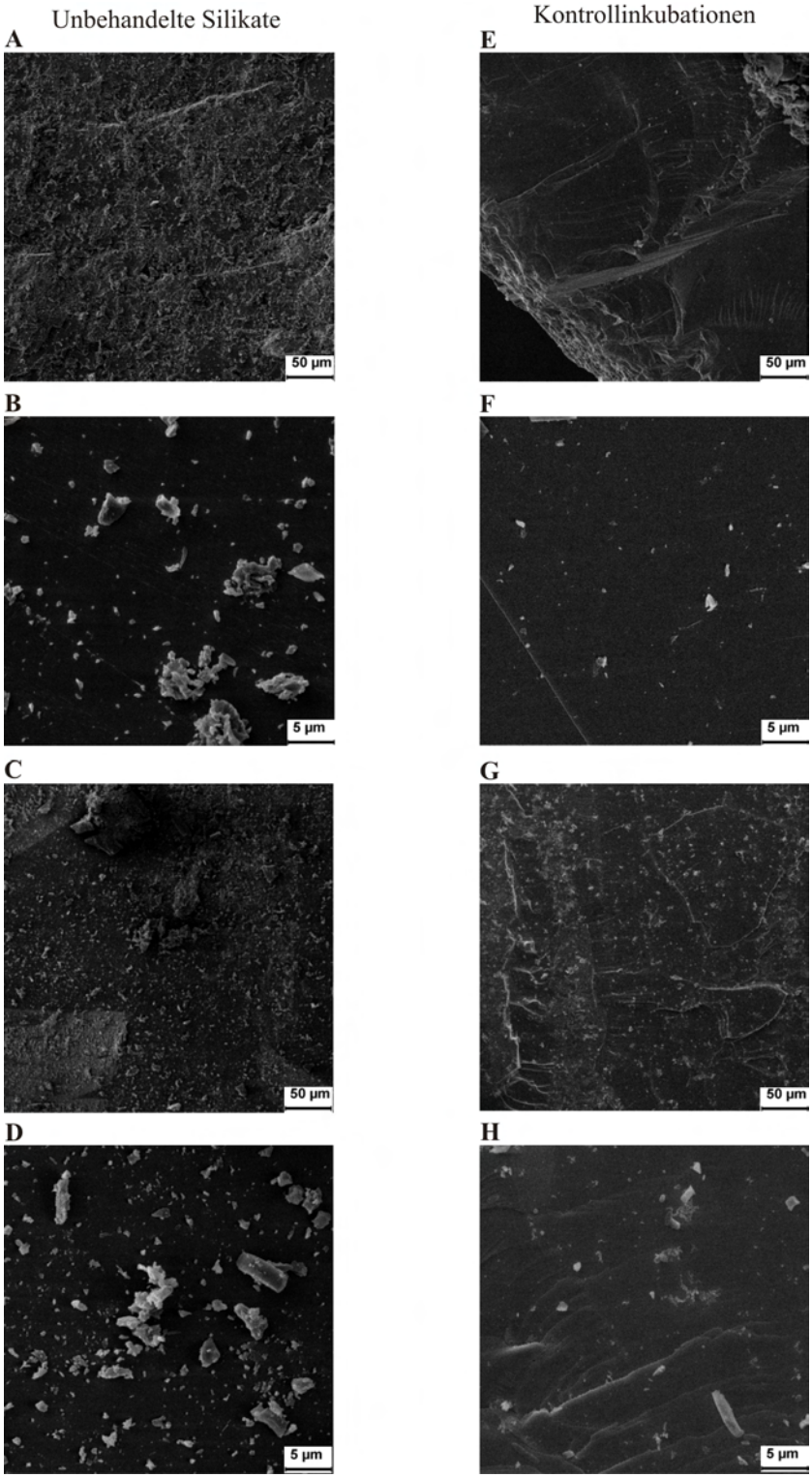

Abb. 5.20: Unbehandelte Silikate und Kontrollinkubation A bis D Rohsilikate, die weder mit Medium noch mit Sediment versetzt wurden. Die Oberflächen waren unverletzt und von Kristallbruchstücken, die von der mechanischen Zerkleinerung der Ausgangssilikate herrühren, bedeckt. **A und B** nicht inkubierter Bytownit; **C und D** nicht inkubierter Orthoklas. **D bis H** exemplarischer Vergleich zwischen Bytownit der in Fermentierermedium **E bis F** bzw. in dem für Okinawaproben angesetzten Fermentierermedium inkubiert wurde. Alle Oberflächen waren unverletzt und glatt. Die verbliebenen Kristallbruchstücke waren symmetrisch und zeigten keine Verwitterungsspuren. Der Maßstab für alle Bildteile war entsprechend angegeben.

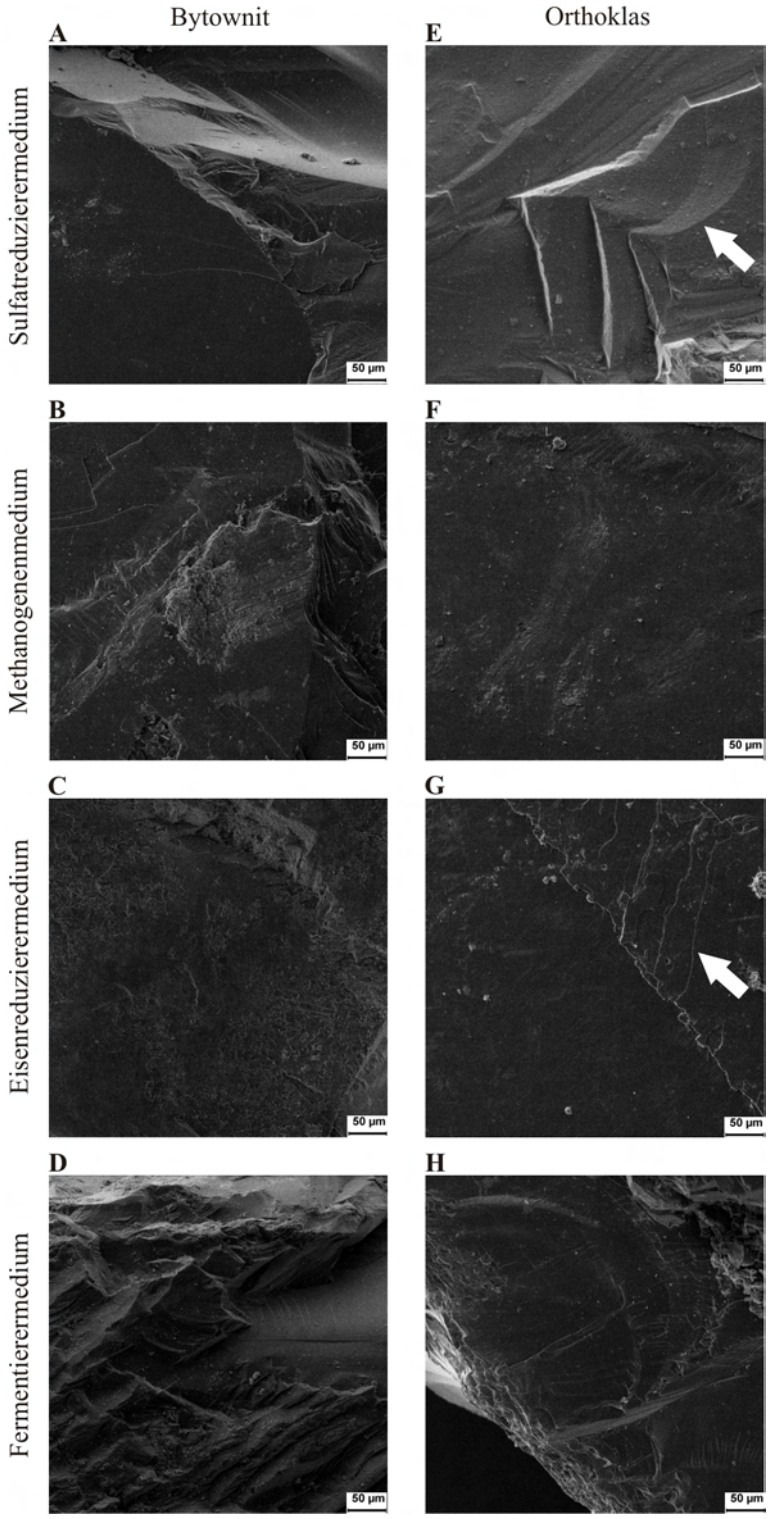

Abb. 5.21: EtOH fixierte Medienkontrollen. Es wurden repräsentative Kristallflächen von Bytownit und Orthoklas in Abhängigkeit von dem Inkubationsmedium dargestellt. Alle hier dargestellten Inkubationen waren sedimentfrei. **A bis D** Bytownit in allen vier Standartmedien, **E bis H** Orthoklas in allen vier Standartmedien. **E** unversehrte Kristallkante (Pfeil) **G** typisch muscheliger Bruch der Silikate (Pfeil). Alle Oberflächen waren eben und unverletzt. Es konnten keine Präzipitate oder Bakterien in den Kontrollen detektiert werden. Der Maßstab für alle Bildteile war entsprechend angegeben.

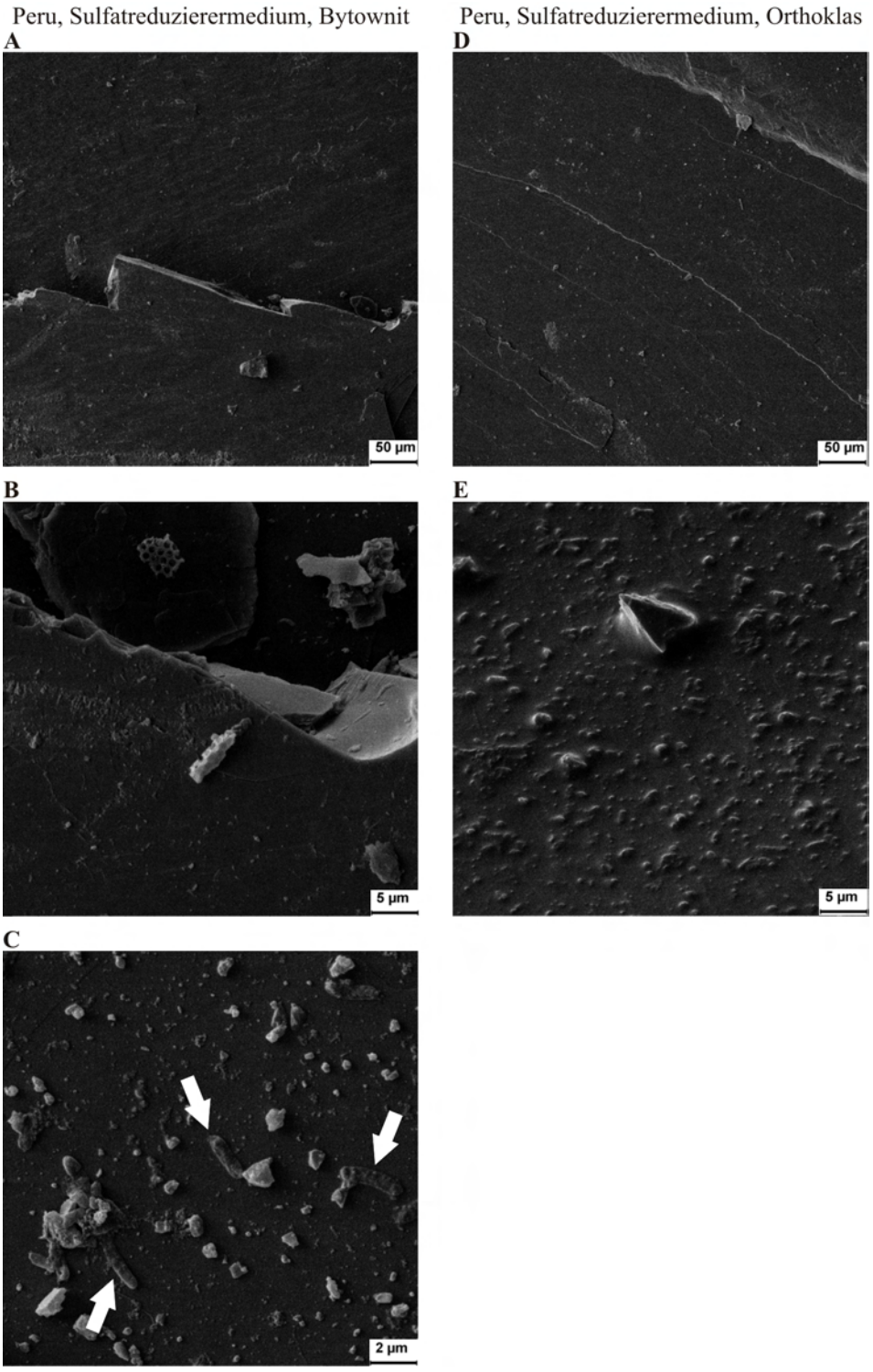

Abb. 5.22: Silikatinkubation in peruanischem Sediment mit Sulfatreduzierermedium, EtOH Fixierung A bis C Peruproben in Sulfatreduzierermedium mit Bytownit inkubiert, Fixierung EtOH In Abbildungsteil **C** wurden intakte, leicht dehydrierte stäbchenförmige Mikroorganismen mit Pfeilen markiert. Die Mikroorganismen befanden sich in unmittelbarer Nähe zu teilweise amorphen Strukturen **D bis F** Peruproben in Sulfatreduzierermedium mit Orthoklas inkubiert, Fixierung EtOH; Der Maßstab für alle Bildteile war entsprechend angegeben.

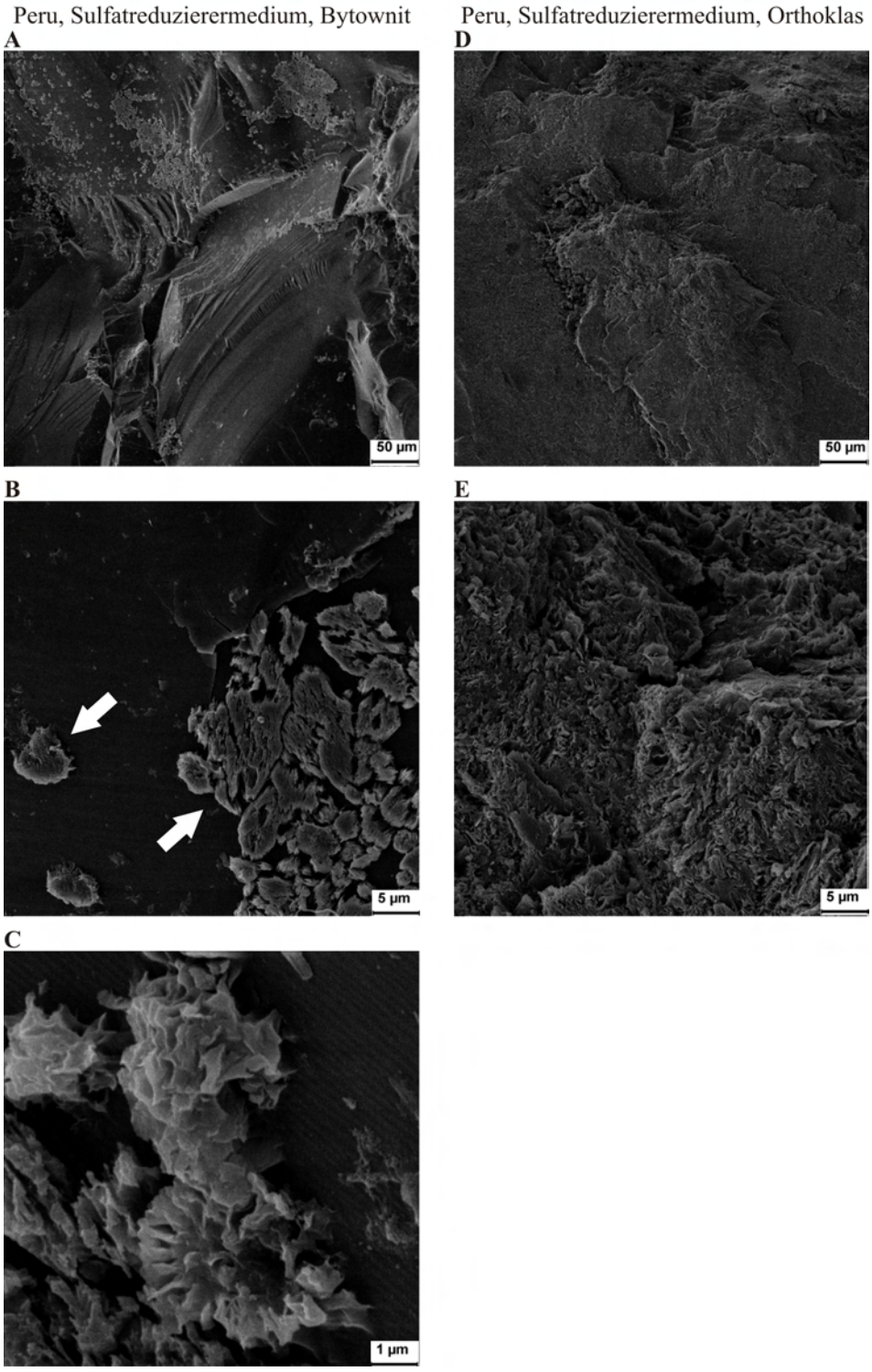

Abb. 5.23: Silikatinkubation in peruanischem Sediment mit Sulfatreduzierermedium, Fixierung nach Karnovsky
A bis C Peruproben in Sulfatreduzierermedium mit Bytownit inkubiert, Fixierung nach Karnovsky **B** flächige, amorphe Strukturen auf der Kristalloberfläche (Pfeil). **C** Nahaufnahme der in (B) markierten Strukturen. **D und E** Peruproben in Sulfatreduzierermedium mit Orthoklas inkubiert, Fixierung nach Karnovsky **D** Überblick über eine großflächig veränderte Silikatoberfläche; **E** Detailaufnahme. Der Maßstab für alle Bildteile war entsprechend angegeben.

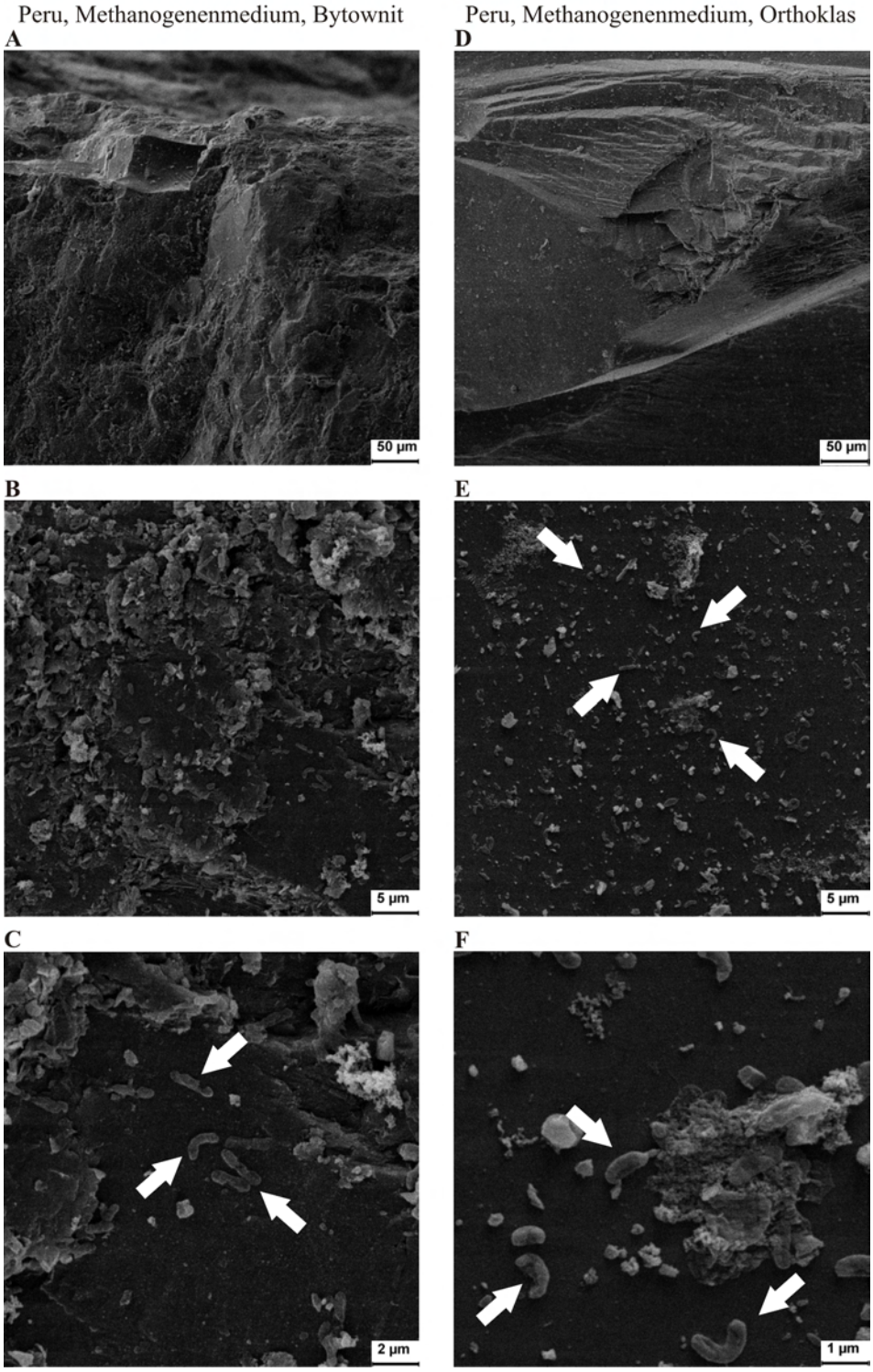

Abb. 5.24: Silikatinkubation in peruanischem Sediment mit Methanogenenmedium, EtOH Fixierung A bis C Peruproben in Methanogenenmedium mit Bytownit inkubiert, Fixierung EtOH **A und B** großflächige Veränderung der Kristalloberflächen; **C** Mikroorganismen auf der veränderten Kristalloberfläche **D bis F** Peruproben in Methanogenenmedium mit Orthoklas inkubiert, Fixierung EtOH; **D** Übersichtsbild; **E** Detailaufnahme mit markierten Mikroorganismen; **F** Nahaufnahme der Mikroorganismen. Der Maßstab für alle Bildteile war entsprechend angegeben.

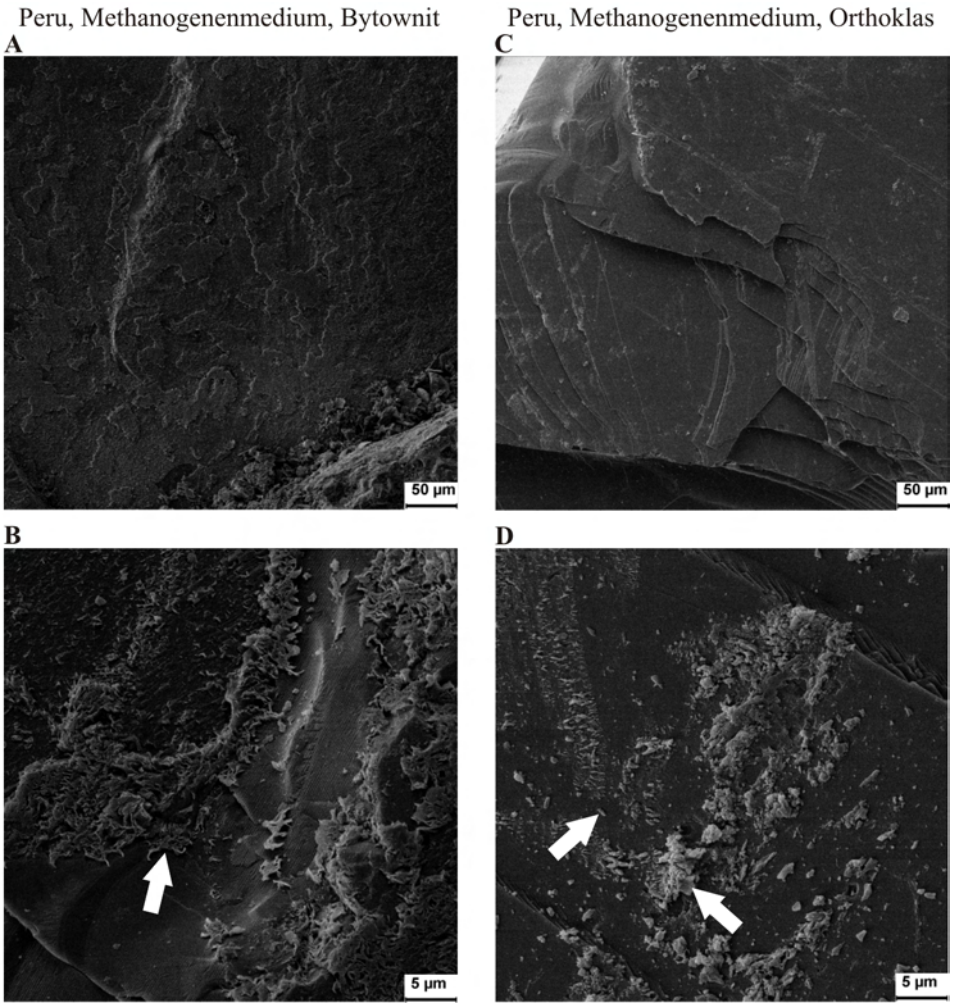

Abb. 5.25: Silikatinkubation in peruanischem Sediment mit Methanogenenmedium, Fixierung nach Karnovsky
A und B Peruproben in Methanogenenmedium mit Bytownit inkubiert, Fixierung nach Karnovsky; **A** Übersichtsbild mit veränderter Oberflächenstruktur des Kristalls **B** Detailaufnahme mit unsymmetrisch aufgelöster Kristalloberfläche; **C und D** Peruproben in Methanogenenmedium mit Orthoklas inkubiert, Fixierung nach Karnovsky; **C** Übersichtsbild mit veränderter Oberflächenstruktur des Kristalls; **D** Mikroorganismus (linker Pfeil) und amorphe präzipitatähnliche Struktur auf der veränderten Kristalloberfläche (rechter Pfeil) Der Maßstab für alle Bildteile war entsprechend angegeben.

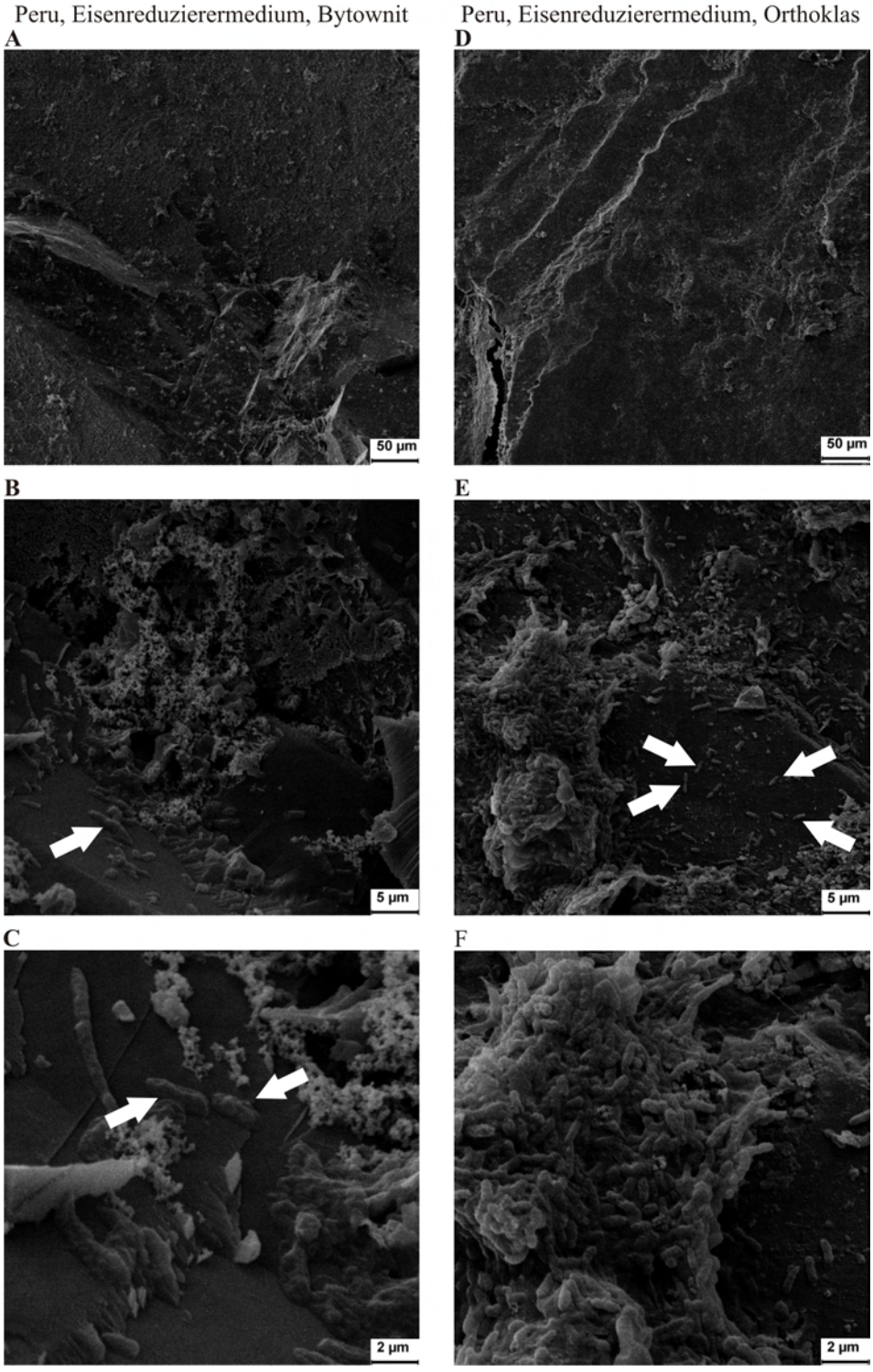

Abb. 5.26: Silikatinkubation in peruanischem Sediment mit Eisenreduzierermedium, EtOH Fixierung A bis C Peruproben in Eisenreduzierermedium mit Bytownit inkubiert, Fixierung EtOH **A** Übersichtsbild über die sehr stark aufgeraute Kristalloberfläche **B** Detailaufnahme mit fixierten Mikroorganismen (Pfeil) **C** Nahaufnahme der Mikroorganismen (Pfeil) **D bis F** Peruproben in Eisenreduzierermedium mit Orthoklas inkubiert, Fixierung EtOH **D** Übersichtsbild über die sehr stark aufgeraute Kristalloberfläche **E** Detailaufnahme mit fixierten Mikroorganismen (Pfeil); **F** massiver Biofilm auf der Silikatoberfläche. Der Maßstab für alle Bildteile war entsprechend angegeben.

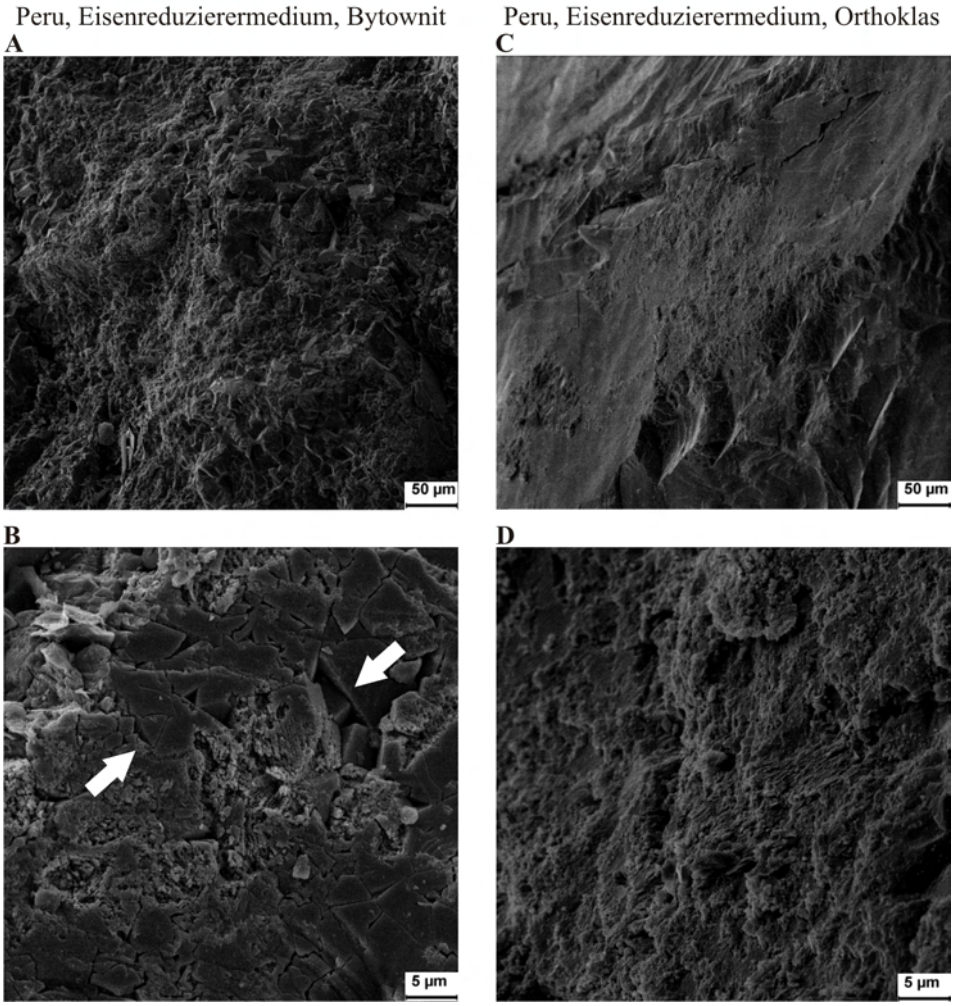

Abb. 5.27: Silikatinkubation in peruanischem Sediment mit Methanogenenmedium, Fixierung nach Karnovsky A und B Peruproben in Eisenreduzierermedium mit Bytownit inkubiert, Fixierung nach Karnovsky **A** Übersichtsbild über die sehr stark aufgeraute Kristalloberfläche; **B** Detailaufnahme von Bruchstellen, an denen ganze Silikatstückchen aus der Gesamtmatrix herausgelöst wurden (Pfeile); **C und D** Peruproben in Eisenreduzierermedium mit Orthoklas inkubiert, Fixierung nach Karnovsky; **C** Übersichtsbild über die sehr stark aufgeraute Kristalloberfläche; **D** Detailaufnahme der völlig aufgerauten und verwitterten Kristalloberfläche. Der Maßstab für alle Bildteile war entsprechend angegeben.

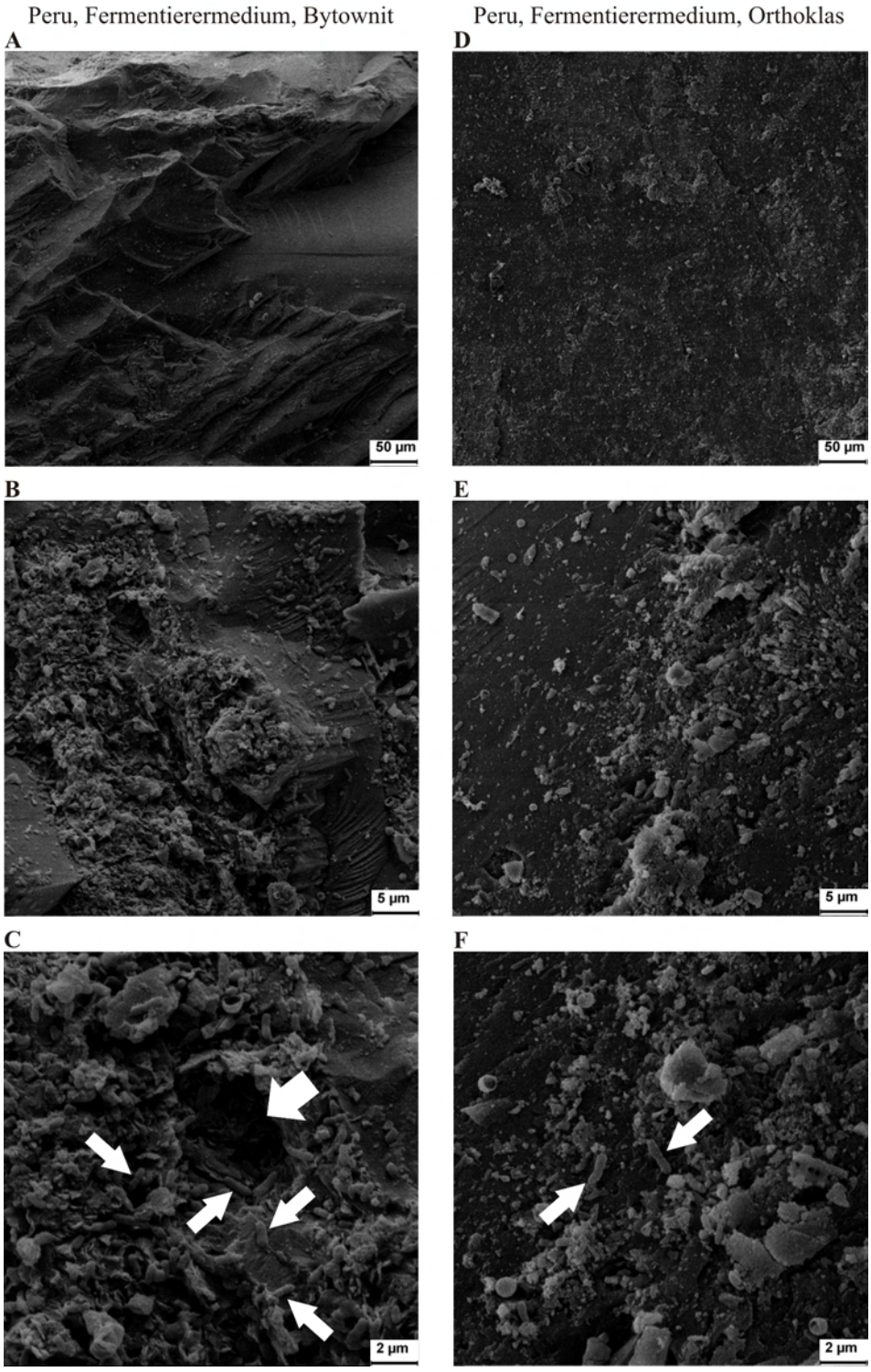

Abb. 5.28: Silikatinkubation in peruanischem Sediment mit Fermentierermedium, EtOH Fixierung A bis C Peruproben in Fermentierermedium mit Bytownit inkubiert, Fixierung EtOH. **A** Übersichtsbild über die Kristalloberfläche; **B** Detailaufnahme der sehr tiefgehend verwitterten Kristallobefläche; **C** Nahaufnahme einer Kavität in der Kristalloberfläche (großer Pfeil) mit assoziierten Mikroorganismen (kleine Pfeile); **D bis F** Peruproben in Fermentierermedium mit Orthoklas inkubiert, Fixierung EtOH; **D** Übersichtsbild über die veränderte Oberflächenstruktur; **E** Detailaufnahme der rauen Oberfläche; **F** Nahaufnahme mit Mikroorganismen (Pfeile) die sich in unmitttelbarer Nähe zu kleinen amorphen Strukturen befanden. Der Maßstab für alle Bildteile war entsprechend angegeben.

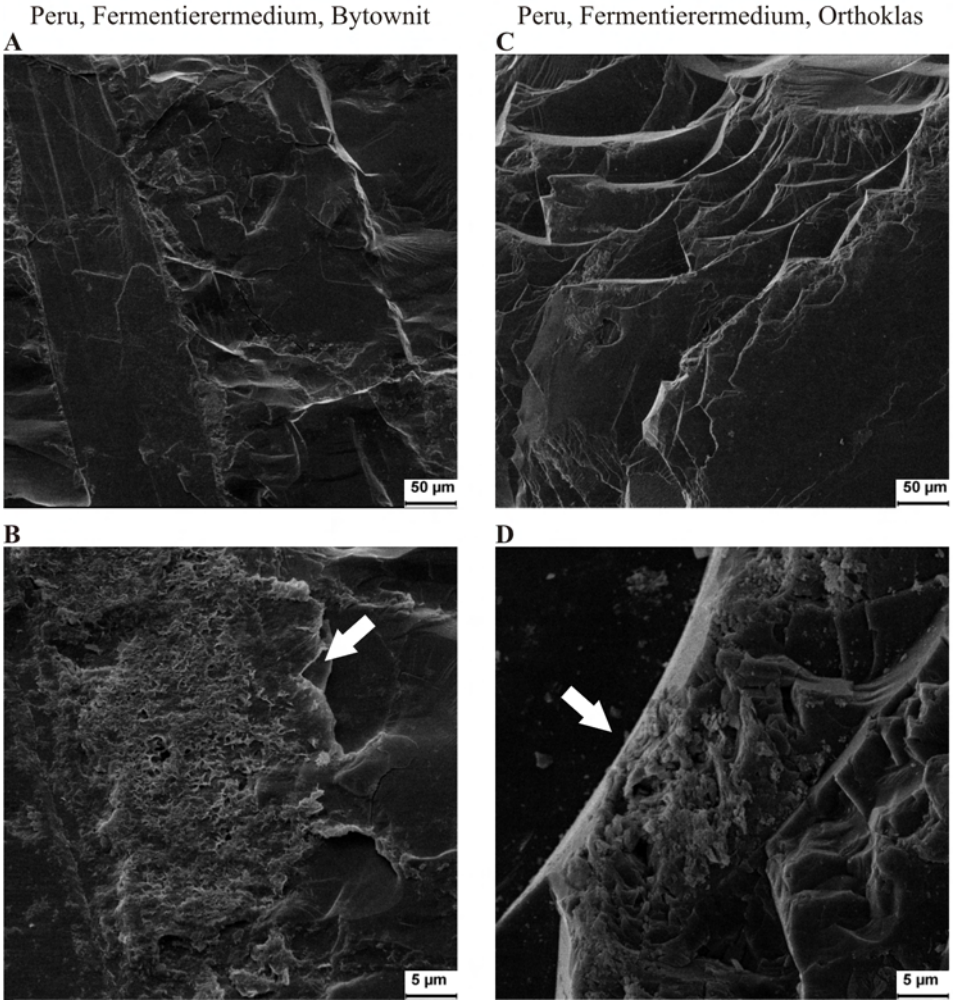

Abb. 5.29: Silikatinkubation in peruanischem Sediment mit Fermentierermedium, Fixierung nach Karnovsky A und B Peruproben in Fermentierermedium mit Bytownit inkubiert, Fixierung nach Karnovsky; **A** Übersichtsbild; **B** Detailaufnahme der Oberflächenveränderung; **C und D** Peruproben in Fermentierermedium mit Orthoklas inkubiert, Fixierung nach Karnovsky; **C** Übersichtsbild; **D** Detailaufnahme von aufgelagerten Strukturen (Pfeil). Der Maßstab für alle Bildteile war entsprechend angegeben.

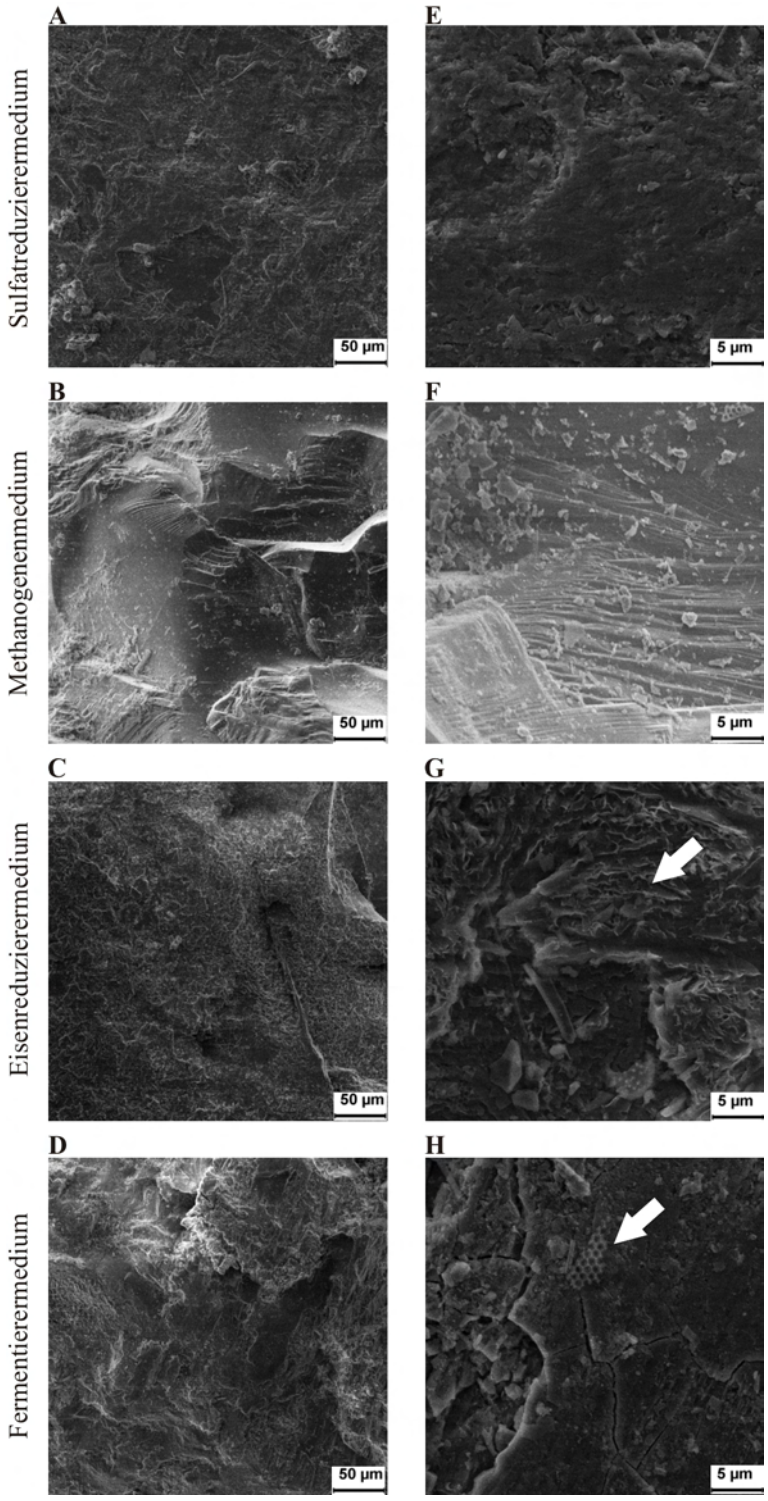

Abb. 5.30: Inokulierte Bytownitkristalle in Sediment aus der methanogenen Zone des Sakhalin Trogs aufgetragen gegen die inkubierten Medien. A bis D Übersichtsbilder der veränderten Bytownitkristalloberflächen in Abhängigkeit von den vier Medien; **E bis H** Detailaufnahmen der veränderten Kristalloberflächen; **G** unsaubere Brüche und asymmetrische Kristallkanten (Pfeil) als Verwitterungsindikator; **H** Diatomenbruchstück (Pfeil) auf der von Rissen übersäten Kristalloberfläche. Der Maßstab für alle Bildteile war entsprechend angegeben.

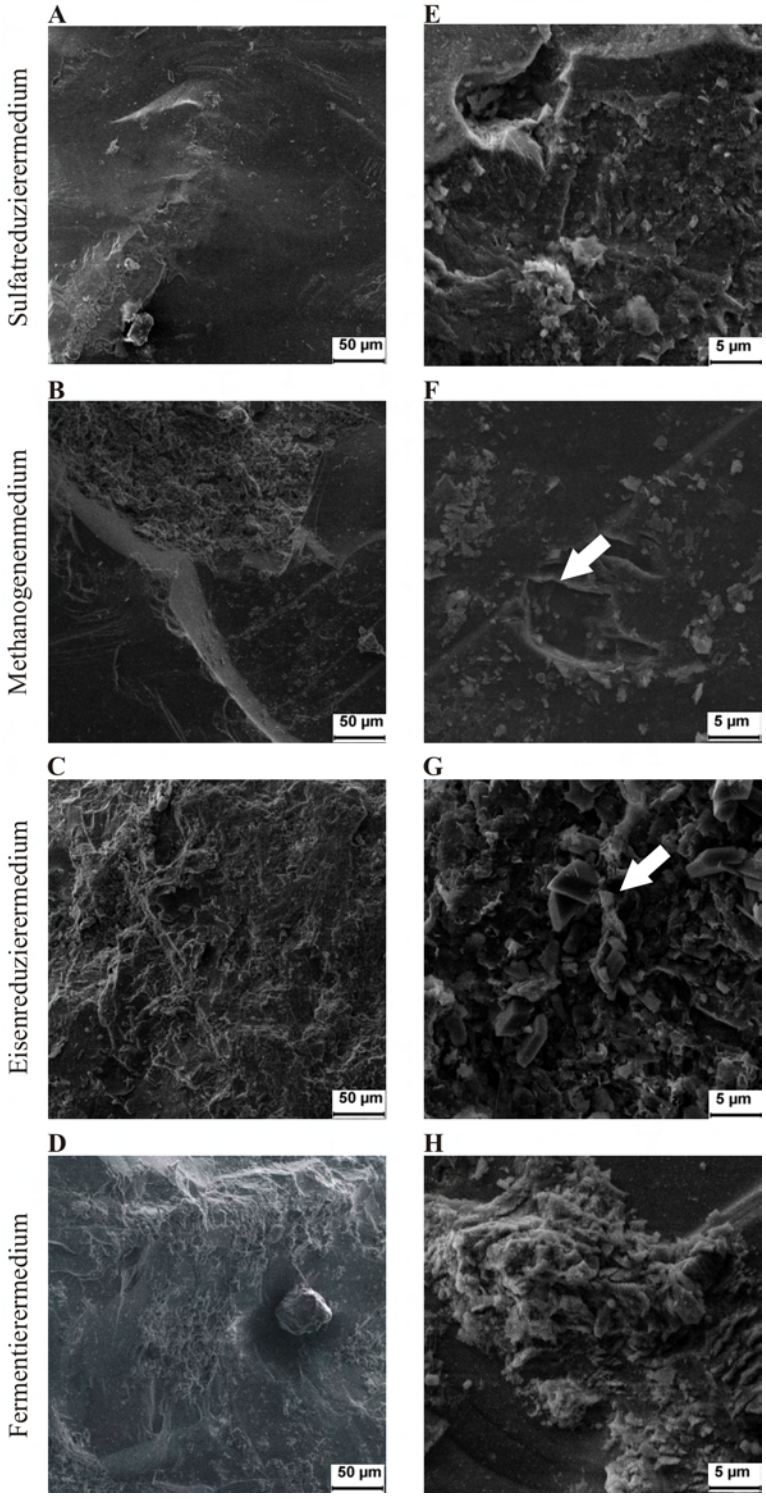

Abb. 5.31: Inokulierte Bytownitkristalle in Sediment aus dem Okinawa Trog aufgetragen gegen die inkubierten Medien. A bis D Übersichtsbilder der stark verwitterten Bytownitkristalloberflächen in Abhängigkeit von den vier Medien; **E bis H** Detailaufnahmen der veränderten Kristalloberflächen; **E** verwitterte Silikatoberfläche mit präzipitatähnlichen Strukturen; **F** aus der Kristallmatrix herausgelöste Silikatstücke (Pfeil); **G** prismenförmige Silikatstückchen gebunden an amorphe sekundäre Strukturen; **H** verwitterte Kristalloberfläche mit präzipitatähnlichen Strukturen. Der Maßstab für alle Bildteile war entsprechend angegeben.

6 Diskussion

Die Gesamtdiskussion der vorliegenden Diplomarbeit gliedert sich in zwei Teile. Im ersten Teil der Diskussion wird die phylogenetische Diversität im Hinblick auf wichtige metabolische Stoffwechselwege analysiert, die im Zusammenhang mit Silikatverwitterung stehen könnten. Die Daten zur Untersuchung der Biodiversität bilden somit die Grundlage für die Diskussion von metabolischen Umsätzen und biogeochemischer Aktivität. Ziel ist es die mikrobiell vermittelten Stoffumsätze in einen Gesamtkontext mit den in den entsprechenden Sedimenten nachgewiesenen Organismen zu bringen. Im zweiten Teil der Diskussion werden die verwendeten Materialien und Methoden einer kritischen Prüfung unterzogen. Aus den während dieser Diplomarbeit gewonnenen Ergebnissen werden methodische Änderungen für z.B. die Lagerung der Sedimentkerne, die Konzeption des Mikrokosmen und die Versuchsprotokolle vorgeschlagen.

6.1 Phylogenetische Diversität

6.1.1 Sedimente

In der vorliegenden Arbeit wurden die Sedimente des Sakhalin Trogs, sowie Sedimentproben aus dem peruanischen Schelf phylogenetisch analysiert. Die mikrobielle Gemeinschaft der Sedimente aus Okinawa wurde bereits in Parallelstudien untersucht [Inagaki *et al.*, Nunoura *et al.*, 2010; 2006; Yanagawa, 2010].

6.1.2 Sakhalin, Sulfatreduziererzone

[Abb. 5.14 Bildteil A; 5.15 Bildteil A]
Aus Sedimentproben der Sulfatreduziererzone des Sakhalin Trogs konnte neben 16S rDNA auch 18S rDNA amplifiziert werden. Da eine Vielzahl von eukaryotischen Organismen, wie z.B. Flechten und Pilze im Zusammenhang mit Verwitterungsprozessen stehen, wurden diese Treffer ebenfalls sequenziert.

16S rDNA-Analyse

Die 16 S rDNA-Analysen des Sakhalinsediments aus der Sulfatreduziererzone zeigten dass 50% der detektierten archaeellen Gemeinschaft auf Mitglieder der *Marine Group I* entfielen, 1/3 der 24 Sequenzen konnten der *Marine Benthic Group B* zugeordnet werden. Dieses Ergebnis deckt sich

mit früheren Sedimentanalysen aus dem Sakhalin Trog, wobei zu beachten ist, dass die *Deep-Sea Archaeal Group* der *Marine Benthic Group B* entspricht [Inagaki *et al.*, 2003]. Die in der Publikation von Inagaki et al. beschriebenen Grünen Nichtschwefelbakterien im Sediment konnten nicht nachgewiesen werden. Mitglieder der *Marine Hydrothermal Vent Group* sind auch an Thermalquellen (*hydrothermal vents*) wie denen im Okinawa Trog beschrieben

6.1.3 Sakhalin, Methanogenenzone

[Abb. 5.14 Bildteil B; 5.15 Bildteil B]

In Hinblick auf die archaeelle Gemeinschaft wird das Sediment der methanogenen Zone des Sakhalin Trogs deutlich von der *Marine Benthic Group B*, mit einem 14 von 22 Sequenzen dominiert. Dieses Ergebnis wird von früheren Analysen unterstützt [Inagaki *et al.*, 2003]. Bei der bakteriellen Zusammensetzung ergibt sich ein von der Literatur abweichendes Bild. Obwohl das Sediment optisch eher pelagischem Ton als vulkanischer Asche zugeordnet werden kann, entspricht die mikrobielle Zusammensetzung eher der in vulkanischer Asche [Inagaki *et al.*, 2003]. Diese Methanogenenzone des Sakhalin Trogs wird von Sequenzen der γ-Proteobakterien, im Speziellen der Gattung *Halomonas* dominiert, die 30% der sequenzierten Ergebnisse ausmachen. *Halomonas* wird die aerobe Oxidation von Thiosulfaten und Sulfiden zugeschrieben. Diese ist eng an den Stickstoffkreislauf geknüpft [Sorokin, 2003]. Diese halotoleranten *Halomonas*-Bakterien benötigen Sauerstoff und organische Substrate für ihren Stoffwechsel. Interessanterweise finden sich keine *Halomonas*-Sequenzen in dem höhergelegenen Sediment. Die Gesamtheit der γ-Proteobakterientreffer macht über 50% der hier gefunden Sequenzen aus. *Actinobacteria* sind stark in den Kohlenstoffkreislauf eingebunden. Sie mobilisieren gelösten organischen Kohlenstoff (DOC) und saisonale eingetragenes partikuläres organisches Material (POM) [Bull *et al.*, 2005]. Ein Literaturabgleich zeigt deutlich eine hohe Biodiversität in den Actinobakterien [Inagaki *et al.*, 2003; Ward and Bora, 2006]. Bei *Azoarcus sp.* handelt es sich um ein β-Proteobakterium. Es wurde im Zusammenhang mit dem Abbau organischen Substanzen und als diazotrophes Bakterium an terrestrischen pflanzlichen Rhizomen beschrieben [Reinhold-Hurek *et al.*, 1993]. In den für diese Diplomarbeit durchgeführten Versuchen wurde keine messbare Auswirkung auf das N_2-Level festgestellt. Die Aktivität des Bakteriums bzw. seiner Enzyme ist nach der aeroben Lagerung unwahrscheinlich. Da die für Stickstofffixierung notwendige Nitrogenase durch Sauerstoff irreversibel inhibiert wird, ist eine Reaktivierung in den anaeroben Mikrokosmen zweifelhaft. Bei den *Rhodobacteraceae* handelt es sich um eine relativ gut beschriebene Gruppe, die zu Oberflächenbesiedlung neigt

und ggf. über eine degenerierte Chemotaxis verfügt [Slightom and Buchan, 2009]. Basierend auf der Hypothese, dass Mikroorganismen ggf. gezielt Fe- oder P-Verbindungen aus Silikaten lösen, wäre ein Chemotaxis zur Detektion von Nährstoffgradienten ausgehend von Silikaten von entscheidendem Vorteil. Auch die Fähigkeit zur Oberflächenbesiedlung könnte für eine konzertierte Aktion von *Rhodobacteraceae* sprechen. Die Sekundärmetabolite der *Rhodobacteraceae* sind divers und umfassen auch acylierte Homoserinlactone, die im Zusammenhang mit der Bildung von Exoenzymen stehen [Brinkhoff *et al.*, 2008]. Mitglieder der *Rhodobacteraceae* wurden auch im Nankai Trog, allerdings hauptsächlich in einer Sedimenttiefe von 0-20 cm nachgewiesen [Buchan *et al.*, 2005]. Für eine genauere metabolische und biogeochemische Einordnung wäre eine Analyse der mRNA oder die Suche nach Genen für Schlüsselenzymen per PCR hilfreich. Auf Grund der hohen Abundanz in den Sequenzen und den beschriebenen physiologischen Fähigkeiten sind *Rhodobacteraceae* für weitere Untersuchungen interessant. Einige Mitglieder der *Rhodobacteraceae* wurden als anaerob phototroph beschrieben [Imhoff, 2001]. Auf Grund der Sedimenttiefe wird diese metabolische Variante für diese Probe hingegen als unwahrscheinlich eingestuft. Die Inkubation der Mikrokosmen in Dunkelheit erscheint jedoch sinnvoll, um lichtabhängige Prozesse grundsätzlich auszuschließen. *Silicibacter pomeroyi* ermöglicht die Bildung von klimarelevantem Dimethylsulfoxid und zeigt ein starkes *quorum-sensing*-Verhalten [Wagner-Doebler and Biebl, 2006]. Das *quorum-sensing*-Verhalten von *Silicibacter pomeroyi* würde ein konzertiertes Auftreten von Mikroorganismen auf Silikaten ermöglichen. Mikroorganismen die erfolgreich Silikate besiedeln und ggf. verwittern können, könnten über biochemische Signalstoffe entsprechende Informationen weiterleiten. Zwischen den Sequenzen von Mikroorganismen mit hoher Relevanz für biogeochemische Prozesse finden sich auch für diesen Forschungsansatz irrelevante Treffer, wie der des Fischpathogens *Piscirickettsia* [Fryer and Hedrick, 2003] und der obligat Humanpathogen *Brevundimonas* [Abraham *et al.*, 1999]. Die Einschätzung der *Sinobacteraceae* ist zur Zeit noch nicht sicher möglich, da sie physiologisch bisher kaum erfasst sind [Zhou *et al.*, 2008].

6.1.4 Peru

[Abb. 5.14 Bildteil C; 5.15 Bildteil C]

Die positive Sequenzierung von *Marine Benthic Group B* sowie der *Miscellaneous Crenarcheotic Group*, die zusammen 40% der sequenzierten Klone ausmachten, wurden im Zusammenhang mit anaerober Methanotrophie beschrieben [Biddle *et al.*, 2006]. Es konnten keine Sequenzen nachgewiesen werden, die in direktem Zusammenhang mit methanogenen Archaeen stehen. Im

Gegensatz dazu konnte über den Inkubationszeitraum Methanentwicklung nachgewiesen werden. Eine Möglichkeit wäre, dass eine kleine Gruppe, schwer zu isolierender Archaeen für die entsprechende Methanproduktion ausreichend war. Diese konnten in der Sequenzierung zunächst nicht nachgewiesen werden, jedoch kann es in dem selektiven Medium zu Anreicherungseffekten gekommen sein. Das peruanische Sediment war von den hier analysierten Sedimenten mit 27 verschiedenen phylogenetischen Zuordnungen im Reich in der Domäne der Bakterien am artenreichsten. Proteobakterien, speziell der γ- und δ-Klassen, machen in dem peruanischen Sediment zusammen über 60% der sequenzierten Treffer aus. Zu den δ-Proteobakterien gehört eine Vielzahl von Sulfatreduzierern. Mit einem Anteil von 16% der Sequenzen aus dem peruanischen Habitat, stellen *Desulfosarcina* und phylogenetisch nahe Verwandte die größte, zusammenhängende Gruppe. Dieser Anteil lässt sich bereits als Indiz für einen Sulfatreduziererzone im Sediment werten [Leloup *et al.*, 2009]. Zusammen mit den weiteren Sulfatreduzierern wie z.B. *Sulfurimonas* sind über 30% aller Sequenzen diesem metabolischen Spektrum zuzuordnen. Auch bei dem γ-Proteobakterium *Thiomicrospira* handelt es sich um ein schwefelreduzierendes chemolithotrophes Bakterium [Ghosh and Dam, 2009]. Die Einordnung von *Sva0485* ist noch unsicher, phylogenetisch clustert es aber bei Sulfatreduzierern [Ravenschlag *et al.*, 1999]. Die hohe Abundanz von Sequenzen sulfatreduzierender Bakterien ist in Übereinstimmung mit mit dem experimentell beobachteten Anstieg der Sulfidkonzentration auf über 27 mM. In vorherigen Studien konnte bereits gezeigt werden, dass *Desulfosarcina* zu einer Sulfidentwicklung von über 12 mM binnen drei Monaten befähigt ist [Kniemeyer *et al.*, 2007]. Diese Konzentration wurde in den Umweltproben der peruanischen Mikrokosmen übertroffen.

Für *Desulfobulbus* [Holmes *et al.*, 2004] konnte ebenso wie für *Shewanella* [Bretschger *et al.*, 2007] metallreduzierendes Verhalten auf Hartsubstraten gezeigt werden. *Desulfobulbus* ist in der Lage neben Sulfat auch Fe(III) als terminalen Elektronenakzeptor zu verwenden und ist somit theoretisch in der Lage strukturell koordiniertes Eisen in Silikaten zu reduzieren. Eine Fe(III)-Reduktion in den Kristallen könnte dann eine strukturelle Auflösung der Silikate bedingen. Die Mitglieder der *Acidithiobacillus* sind typische Sedimentbakterien, metabolisch vielfältig und umfassen sowohl Denitrifizierer als auch Eisenreduzierer [Barns *et al.*, 1999; Kelly and Wood, 2000a/b].

6.1.5 Okinawa

Die Sequenzdaten für das Sediment des Okinawa Trogs stammen aus Parallelstudien [Inagaki *et al.*, 2006; Nunoura *et al.*, 2010; Yanagawa, 2010]. *Chloroflexi* sowie δ- bzw. γ-Proteobakterien machen hier einen Großteil der mikrobiellen Gemeinschaft aus. Das Sediment wurde als aktiv sulfatreduzierend beschrieben, was durch die entsprechenden Sequenzierungsergebnisse gestützt wird [Yanagawa, 2010]. Bis zu 50% der Sequenzen verweisen auf Bakterien mit entsprechenden metabolischen Ausrichtungen. Der Einfluss von sulfatreduzierenden und methanogenen Konsortien bleibt bisher unsicher [Nunoura *et al.*, 2010]. In Hinblick auf Silikatverwitterung sind Acidobakterien oder Schwefelreduzierer der δ- bzw. γ-Proteobakterien von Interesse.

6.2 Sulfid

Die im Zuge der vorliegenden Diplomarbeit durchgeführten Inkubationsexperimente zeigen nur bei den Proben des peruanischen Sediments einen deutlichen Sulfidanstieg (> 27 mM) [Abb. 5.1]. Der Sulfidanstieg, in den Mikrokosmen mit selektivem Sulfatreduzierermedium gemessen, ist in Einklang mit den phylogenetischen Analysen. In dem peruanischen Sediment wurden 30% der analysierten Sequenzen Sulfatreduzierern zugeordnet. Auffällig ist die sehr geringe Sulfatreduktionsrate in dem Okinawasediment. In Laborexperimenten konnten für das Sediment aus Okinawa Sulfatreduktionsraten im nM-Bereich pro Tag gemessen werden [Yanagawa, 2010]. Eine mögliche Ursache könnte zum Einen in der gesamt kürzeren Inkubationszeit des Okinawasediments in den Mikrokosmen, zum Anderen in dem geringeren pH-Wert des Mediums liegen. Der geringere pH-Wert könnte die Sulfatreduktion inhibieren. Zusammenfassend kann für die mikrobielle Silikatverwitterung kein direkter, funktioneller Zusammenhang zu der Reduktion von Sulfat erkannt werden. Dabei muss beachtet werden, dass Metallionen mit freiem Sulfid zu unlöslichen Metallsulfiden reagieren können. Das Ausfallen der Metallsulfide würde dann die Analysen zur Freisetzung von Metallen aus verwitterten Silikaten verfälschen. Ein direkter Zusammenhang zwischen hohen Sulfidwerten und Silikatverwitterung konnte auch durch die REM-Aufnahmen nicht gezeigt werden. Eine Anstieg der Sulfidkonzentration in den Mikrokosmen mit peruanischem Sediment wird als Indikator für metabolisch aktives Sediment gewertet.

6.3 Methan

Mitglieder der *Marine Benthic Group B* konnten in allen vier Sedimenten nachgewiesen werden. In den Sedimenten aus Sakhalin zeigte sich eine deutlich höhere Abundanz von *Marine Benthic Group B* in größerer Tiefe und somit in der methanogenen Zone [Abb. 5.14].Die bisher bekannten Daten deuten an, dass die metabolischen Umsätze von Methan durch Mitglieder der archaeellen Domäne erfolgen [Teske and Sørensen, 2007]. Das peruanische Sediment zeigte als einziges eine deutliche Methanentwicklung [Abb. 5.2]. Da die Methanmessungen in Mikrokosmen mit selektiven Methanognenmedium erfolgte, kann von einer erfolgreichen Anreicherung bzw. Aktivierung der Methanogenen ausgegangen werden. Für einen deutlichen Anstieg der CH_4-Werte in dem Okinawasediment hätte ggf. die Inkubationszeit verlängert werden müssen.

Für das weitere Verständnis der Methanogenese wäre die phylogenetische Suche basierend auf dem *mcrA*-Gen [Ferry, 1999] von Interesse. Das *mcrA*-Genprodukt katalysiert den finalen Schritt der Methanogenese. Über genauere Analysen wäre es möglich potentielle Substrate der aktiven Methanogenen auszumachen und sie z.B. in H_2/ CO_2, Methansäure oder Ethansäure als Elektronendonor nutzende Familien einzuteilen [Dhillon *et al.*, 2005]. Methansäure und Ethansäure wurden als organische Säuren in den Mikrokosmen mit Fermentierermedium gemessen und können potentiell Silikate verwittern. Eine metabolische Kopplung von Methanogenese und Fermentierung ist somit möglich. Ein direkter Zusammenhang zwischen Methanentwicklung und inokuliertem Silikat konnte nicht gezeigt werden.

6.4 CO_2

Während der Verwitterung von Silikat wird CO_2 als Carbonat gebunden. Die dargestellten Zeitprofile deuten eine CO_2-Senke an, die allerdings zum Ende der Inkubationszeit wieder aufgehoben wurde [Abb. 5.4]. Hierbei kann ein Artefakt durch Verdünnen ausgeschlossen werden. Die Volumen wurden exakt mit einer µl-Spritze entnommen und die Verdünnungen in die Graphen eingerechnet. Dieser Verlauf könnte ein Indiz dafür sein, dass die Silikatverwitterung entsprechend der Formeln (1.1) bis (1.3) stattfindet, dieses jedoch nicht in der CO_2-Massenbilanz erkennbar wird und durch andere biotische oder abiotische Prozesse CO_2 freigesetzt wird. Selbst wenn der Prozess nicht exakt umgekehrt wird ist es möglich, dass durch die Freisetzung von organischen Säuren oder durch die Aufnahme von CO_2 aus der Gasphase eine Ansäuerung des Mediums erfolgte. In der sauren Umgebung könnten hypothetisch präzipitierten Carbonate aufgelöst. Die Auflösung

von Carbonaten würde vormals gebundenes CO_2 freisetzen. Dem Abbau organischer Verbindungen unter Bildung von CO_2 stehen demnach potentiell CO_2 bindende Prozesse gegenüber. Zudem können Sulfatreduzierer Ethansäure zu CO_2 reduzieren. Ethansäure liegt in allen analysierten Proben im mM-Bereich vor, ein Anstieg der CO_2-Konzentration über diesen Weg wäre somit möglich.

Ebenso ist es möglich, dass CO_2 methanogen umgesetzt wurde. Jedoch konnte dieser Prozess nicht durch einen Anstieg der Methankonzentration verifiziert werden, da die CO_2-Entwicklung nur in den Proben mit Fermentierermedium verfolgt wurden, an denen parallel kein Methan gemessen wurde. Aufgrund der zentralen Bedeutung der CO_2 Konzentration in den experimentellen Untersuchungen sollte diese Variable in zukünftigen Studien in allen Inkubationen bestimmt werden. Der finale Anstieg der CO_2-Konzentration ist bisher noch nicht erklärbar. Ein Abweichung in den Inkubationsbedingungen kann nicht mit aller Sicherheit ausgeschlossen werden.

6.5 Eisen

[Abb, 5.3]

Eisenreduzierende Bakterien wie z.B. *Shewanella sp.* sind in der Lage bioverfügbares Fe(III) zu Fe(II) zu reduzieren [Myers and Nealson, 1990]. Neben Organismen wie *Shewanella sp.*, können z.B. auch einige Arten der *Rhodobacter* Eisen reduzieren [Dobbin *et al.*, 1996]. Zudem sind zahlreiche Organismen wie z.B. *Clostridium* bekannt, die zwar Fe(III) reduzieren, dabei jedoch Glukose als Elektronendonor nutzen [Falkow, 2006]. Der Einfluss von Glukose kann in den vorliegenden Experimenten nicht verifiziert werden, da die mit Glukose angereicherten Fermentierermedien nicht auf ihren Eisengehalt hin untersucht wurden. Hier zeigt sich erneut die Notwendigkeit von zukünftig umfassenderen Analysen in weitergehenden Untersuchungen. In allen vier Sedimenten wurden mittels phylogenetischer Analyse Gattungen oder Familien nachgewiesen, die im Zusammenhang mit Eisenreduktion beschrieben wurden. Im Zusammenhang mit Fe(III)-Reduktion wurden Mikroorganismen beschrieben, die die Oxidation von organischen Säuren an die Reduktion von Fe(III) koppeln können [Lovley, 1993]. Gekoppelte metabolische Prozesse wie Fermentation und Eisenreduktion, die in den Mikrokosmen ggf. zeitlich versetzt auftreten sind somit als wahrscheinlich anzusehen. Die exakte Kopplung der Prozesse, sowie der ggf. gemeinsame Einfluss auf die Silikatverwitterung kann Gegenstand weiterer Forschung sein. Die mikrobielle Freisetzung von strukturell koordiniertem Eisen aus Silikaten hätte eine Freisetzung der Gerüstsilikate in das Medium zur Folge. Ein solcher Anstieg kann in allen mit Eisenreduzierermedium inkubierten Pro-

ben festgestellt werden, der stärkste Anstieg war in Peru zu detektieren. Die REM-Aufnahmen der in Eisenreduzierermedium inkubierten Silikate zeigen sehr deutliche Oberflächenveränderungen, die auf primäre Verwitterungsreaktionen und auf sekundäre Präzipitationen hinweisen. Die Reduktion von strukturell koordiniertem Eisen ist ein entscheidender Parameter der Silikatverwitterung. Eisenreduzierende Bakterien können mikrobielle Silikatverwitterung bedingen.

6.6 Silikat

[Abb. 5.5; Abb. 5.6]
Die analysierten Proben aller mit Sediment inkubierten Mikrokosmen zeigen eine deutliche Tendenz zur Silikatfreisetzung. In Abgleich mit den REM-Aufnahmen und den dort sichtbaren starken Verwitterungserscheinungen, sowie den Silikatverläufen in den Medienkontrollen kann der Hauptteil des Silikatzuwachses einer realen Freisetzung zugeordnet werden. Im Eisenreduzierermedium zeigen auch die Medienkontrollen so hohe Si-Konzentrationen, dass ein Teil der Silikatfreisetzung in den Sedimentinkubationen überdeckt wurde. Eine Interaktion zwischen Borosilikatglas und Fe-Medium kann somit als wahrscheinlich angenommen werde. Die Si-Konzentrationen der peruanischen Mikrokosmen liegen deutlich über den Medienkontrollen. In dem peruanischen Sediment ist die Si-Freisetzung demnach am ausgeprägtesten.

Allgemein wurde kein Unterschied zwischen den mit Silikat inokulierten und den reinen Sedimentinkubationen deutlich. Die deutliche Freisetzung von Si auch in nicht inokulierten Proben zeigt, dass Silikatverwitterung im Sediment stattfindet. Da Silikat ein Hauptbestandteil des Sediments war, konnte Silikatverwitterung auch an den Sedimentkörnern selbst stattfinden. Die Sedimentkörner bieten im Vergleich zu den inokulierten Silikaten eine bedeutend größere reaktive Oberfläche. Die hier verwendeten Kristalle beschleunigen den Prozess nicht notwendigerweise sondern lieferten nur die Grundlage für REM- und CARD-FISH-Analysen. Sedimentfreie Inkubation von Kulturen sollte hier auf Dauer angestrebt werden. In sedimentfreien Kulturen wären Effekte auf inokulierten Kristallen, die dann die Haupt-Si-Quelle und das einzige Hartsubstrat darstellen würden, wesentlich deutlicher zu erwarten.

Die stärkste Si-Freisetzung, ggf. durch organische Säuren war allgemein in den Fermentierermedien zu beobachten. Wie bereits in früheren Studien gezeigt werden konnte, sind einige Bakterien über die Exkretion von organischen Säuren in der Lage Silikatverwitterung auch bei niedrigen Temperaturen deutlich zu beschleunigen. Dabei wird Glukose enzymatisch zu Gluconsäure oxi-

diert. Bereits bei einer Konzentration von 1 mM Glukose konnten binnen 15 Tagen 75 mM Silikat freigesetzt werden [Welch and Ullman, 1999]. Diese Beobachtung steht tendenziell in Übereinstimmung mit den hier gewonnenen Daten. In den mit 3 mM Glukose versetzten Fermentierermedien zeigten sich in allen Sedimenten deutlich stärkere Verwitterungserscheinungen an den inokulierten Silikaten.

Eine weitere Quelle für Silikat könnte silikathaltiges Plankton sein. Ein nachträglicher Eintrag in das System ist nicht möglich. Bei den Sequenzierungen wurden keine Diatomeen gefunden, auf den REM-Bildern sind jedoch immer wieder Bruchstücke oder auch vollständige Diatomen zu erkennen. Ob ein möglicher mikrobielle Abbau der Diatomeenschalen zu einer Si-Freisetzung führte konnte nicht nachgewiesen werden.

6.7 Organische Säuren

[Abb. 5.7; Abb. 5.8]

In vorherigen Studien konnte bereits gezeigt werden, dass organische Säuren wie Oxalsäure oder Ethansäure Silikate bereits im mM-Bereich auflösen können [Stillings *et al.*, 1996; Pokrovsky *et al.*, 2009]. Organischen Säuren können Protonen an die Mineralienoberflächen abgeben, Metall-Sauerstoffbindungen schwächen oder als Komplexbildner wirken [Welch and Ullman, 1993]. Die hier ermittelten Säurekonzentrationen waren in Mikrokosmen mit Okinawasediment am Höchsten und Vielfältigsten waren. Demzufolge wären hier auch die stärksten Auflösungserscheinungen zu erwarten gewesen. Es konnte zwar eine Silikatfreisetzung in den mit Okinawasediment inkubierten Mikrokosmen gemessen werden, die Silikatwerte waren jedoch nicht höher als in den Inkubationen der anderen Sedimente. Auch die REM-Aufnahmen legen eine Verwitterung nahe, können aber keine besonders starke Zersetzungen zeigen. Die in allen Proben gemessene Ethansäure-Konzentration scheint in Abgleich mit den REM-Bildern nicht der Hauptträger der Verwitterungsleistung zu sein. Zur genaueren Klärung wären Auflösungsexperimente mit den vorliegenden Kontrollen und definierten organischen Säuren notwendig.

6.8 Schlüsselelemente

[Abb. 5.9, Abb. 5.10]

In den Proben konnten Schwankungen in der Natriumkonzentration detektiert werden (Daten nicht dargestellt). Ein zusätzlicher Na-Eintrag war jedoch durch z.B. die Na-Acetat-Düngung gegeben,

gleichzeitig kann Natrium auch durch die Silikatverwitterung freigesetzt werden [Wallmann *et al.*, 2008]. Entsprechend

$$\text{Feldspart} + CO_2 \longrightarrow \text{Ton} + HCO_3^- + \text{Metallkationen} \tag{6.1}$$

ist ein Anstieg von Metallkationen ein weiteres deutliches Zeichen für die Silikatverwitterung [Wallmann, 2004]. Die Formel 6.1 setzt stöchiometrisch voraus, dass für die Silikatverwitterung CO_2 zu HCO_3^- umgesetzt wird. Modellgestützte Untersuchungen legen nahe, dass Silikatverwitterung durch hohe DIC- und DOC-Werte beschleunigt werden [Wallmann, 2004]. Der Nährstoffeintrag in Sakhalin ist nicht zuletzt durch den Fluss Amur gegeben, Peru liegt in einem aktiven organikreiche Auftriebsgebiet und Okinawa stellt mit seinen Ventsystemen ebenfalls einen potentiellen DIC bzw. DOC-Quelle dar. Basierend auf einer hypothetischen, durch gelösten Kohlenstoff beschleunigten Silikatverwitterung wäre ein deutlicher Anstieg in den Metallkationen zu erwarten. Während für Eisen eine regelmäßige Messung im Sediment vorliegt, die eine Freisetzung von Fe stützt, wurden die anderen Metalle auf Basis der ICP-OES und ICP-MS Analyse diskutiert. Den ICP-Analysen liegt dabei eine Analyse des Mediums zu Grunde. Eisen nahm sowohl im Eisenreduzier-, als auch im Fermentierermedium ab, ohne dass die Gesamteisen-Werte des Sediments stiegen. Die Magnesiumkonzentration sank in drei Medien (Fe-Red., SR, Ferm.). Ausgenommen von der sinkenden Mg-Konzentration waren die Proben aus den Inkubationen mit Sediment des Okinawa Trogs. Es ist nicht auszuschließen, dass die Mikroorganismen, auf Grund der kürzeren Inkubationsdauer, in diesem Ansatz noch nicht angereichert waren oder ihre volle metabolische Aktivität entfalten konnten.

Die Veränderungen in der Aluminiumkonzentration sind über den Inkubationsverlauf in allen Medien und Habitaten konsistent. Demnach sank die Konzentration von Al über den Inkubationszeitraum deutlich ab. Al zeigt sehr unterschiedliche Effekte auf Mikroorganismen und bindet leicht an Silikate [Pina and Cervantes, 1996]. Dabei muss hier zwischen den Habitaten differenziert werden, denn das Okinawamedium bildet ein Milieu mit deutlich niedrigerem pH-Wert. Dieser beeinflusst die vorherrschende Redoxspezies und somit mikrobielle Aktivität. Zudem konnte gezeigt werden, dass Al, zumindest in Süßwassersystemen, einen Einfluss auf die Löslichkeit von Silikaten haben kann [Yokoyama *et al.*, 2004].

Die Ca-Konzentrationen, die im Überstand gemessen wurden sind relativ heterogen, auch innerhalb einzelner Sedimente. Eine Reaktion zwischen Ca und Spezies des Carbonatpuffersystems ist

möglich. Bei der Silikatverwitterung formell freigesetztes Kalzium wird wahrscheinlich durch die Kalziumcarbonatbildung und Präzipitation überdeckt. Aus einer erhöhten Ca-Freisetzung könnte eine Kalziumcarbonatbildung und folglich eine Präzipitation von Carbonaten abgeleitet werden. Das Präzipitieren der Ca-Verbindungen als nicht lösliche Carbonte würden erklären, dass in der ICP-MS Messung keine deutliche Ca-Freisetzung ins Medium messbar war. Konzentrationsänderungen (positiv und negativ) sind für Kalzium vor Allem im Sulfatreduzierer- und Methanogenenmedium zu beobachten. Bereits vorher beschriebene Ergebnisse deuten an, dass in den unterschiedlichen Horizonten des Sediments des Sakhalin Trogs mit voneinander abweichenden Elementkonzentrationen zu rechnen ist. So wird eine Silikatverwitterung in der tiefer liegenden methanogenen Zone erwartet, in der sulfathaltigen Zone hingegen das sog. *reverse weathering* [Wallmann *et al.*, 2008]. Demnach ergibt sich für die dortigen Prozesse folgende Reaktionsgleichung:

$$\begin{aligned} &\mathrm{biogener\ \ Opal + Metallhydroxide + Na^{+}+} \\ &\mathrm{0,1K^{+} + Mg^{2+} + Ca^{2+} + 5HCO_3^{-}} \longrightarrow \\ &\mathrm{authigene\ \ Silikate + 5,1CO_2} \end{aligned} \tag{6.2}$$

Der Formel (6.2) entsprechend wäre sowohl ein CO_2-Anstieg, als auch eine Senke für einige der Kationen zu erwarten. Die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Ergebnisse decken sich damit nur im Bereich von Kalium. Kalzium und Magnesium zeigen schwache Veränderungen zu beiden Seiten, Mg wird nicht von Orthoklasinkubationen freigesetzt. Die Silikatentwicklung im Sulfatreduzierermedium zeigte eine Freisetzung von Silikat im Sediment der Sulfatreduziererzone, nicht jedoch in der Methanogenenzone. Die CO_2-Entwicklung nimmt hingegen in beiden Zonen über große Teile des Experiments ab. Dieser Trend spiegelt sich in den anderen Medien nicht wider. Diese forcieren jedoch auch andere mikrobielle Prozesse. An dieser Stelle soll ausdrücklich darauf hingewiesen werden, dass die von Wallmann et al. gewonnen geologische Daten aus dem Porenwasser stammen und nur bedingt mit den hier gemessenen Konzentrationen im Medium vergleichbar sind. Die zur Elementbestimmung eingesetzte ICP-MS musste für die vorliegenden Proben neu eingestellt und kalibriert werden. Im Regelfall kann Yttrium als interner Standard gemessen werden. Wie sich experimentell bestätigte, verfügten zumindest die Proben aus Okinawa über ein eigenes Yttrium-Signal [Hongo *et al.*, 2007]. Yttrium konnte somit nicht als interne Standard dienen und musste durch Indium ersetzt werden. Im Zuge der hier beschriebene Anwendung konnte ein neues Parameterprotokoll für die ICP-MS-Messungen etabliert werden.

6.9 REM

[Abb. 5.20 bis Abb. 5.31]

Die dargestellten REM-Bilder sind der sicherste Nachweis für Verwitterungsreaktionen an den Silikaten. Die inkubierten Silikate zeigten eine veränderte Oberflächenstruktur. In den unbehandelten Kontrollen zeigt sich zwar in der 200 bis 500fachen Vergrößerung eine scheinbar unebenere Oberfläche, in den 2000fachen Vergrößerungen wird jedoch deutlich, dass es sich dabei um Kristallsplitter und Staub handelt, die in den Inkubationen durch den Kontakt mit Medium fortgewaschen wurden. Die sedimentfreien Mediumkontrollen bestätigen, dass eine Verwitterung der Kristalle durch den reinen Medienkontakt ausgeschlossen werden kann. Unbehandelte Kristalle und Kristalle in Medienkontrollen zeigen gerade Bruchkanten, parallel verlaufende Kristalllinien, muschelige Bruchkanten und eine geometrische Oberfläche. Die im Ergebnisteil dargestellten Aufnahmen ermöglichen es verschiedene Charakteristika zu benennen die erste Hinweise auf biogeochemische Veränderungen am Kristall darstellen. Hierzu zählen in erster Linie eine Abrundung von Kristallkanten, raue Oberflächenstrukturen, Abtragungen entlang von Spaltebenen sowie das Auftreten von komplexen Oberflächenstrukturen. Es wurden verschiedene Typen von sekundären Oberflächenstrukturen nach den Inkubationen nachgewiesen. So zeigten sich zum Einen komplexe amorphe oder flächige Strukturen [Abbildung 5.22 C]. Die beobachteten Verwitterungserscheinungen stehen in Übereinstimmung mit bereits beschriebenen Effekten [Hiebert and Benett, 1992]. Die dokumentierten veränderten Oberflächenstrukturen ähneln stark bereits beschriebenen Kristallstrukturen, die an einer Einschlussverbindung an der Kristalloberfläche einen Nukleationskeim finden [Vorhies and Gaines, 2009]. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Bennett *et al.* [Bennett *et al.*, 2001] zeigt sich keine vollkommene Besiedlung des Kristalls, sondern eine Besiedlung in distinkten Mustern. Besonders häufig fanden sich Bakterien in Mikronischen wie Kristallbrüchen oder auf Kristalllinien. Diese Beobachtung deckt sich mit den CARD-FISH-Ergebnissen. Auf den REM-Aufnahmen waren teilweise deutlich Diatomenbruchstücke zu erkennen, die nicht mittels 18S rDNA-Analyse erfasst werden konnten. Es wird daher davon ausgegangen, dass es sich bei den Diatomen entweder um abgestorbene Organismen handelt, deren rDNA bereits degradiert wurde, oder die Silikatschilde dem mechanischen Aufschluss zu widerstehen vermochten. Ein Einfluss von Diatomeen auf den Silikatkreislauf wird im Sediment ausgeschlossen.

6.10 CARD-FISH

[Abb. 5.16 bis Abb. 5.19]

Für das Okinawasediment konnte ein erstes positives Ergebnis für die Anwendung von CARD-FISH auf Kristallen erzielt werden. Entsprechend der Sonden wurde eine Gruppe von Bakterien mit an Sicherheit grenzender Wahrscheinlichkeit als *Shewanella* identifiziert. Für die anderen Proben, die in Eisenreduzierermedium inkubiert wurden, ergibt sich ein weniger eindeutiges Bild. Die Abbildungen zeigten das unspezifische Binden der Sonden bzw. Farbstoffe in großem Maß an Kristallflächen, sodass sie ein sehr starkes falsch-positives Hintergrundsignal produzierten. Besonders ausgeprägt war dieses Phänomen an schwer zugänglichen Ecken des Kristalls oder auf Kristalllinien. Wie die REM-Bilder zeigen waren gerade diese geschützten Stellen die bevorzugten Regionen für mikrobielle Aktivität. Innerhalb der falsch-positiven Signale waren Strukturen zu erkennen die ggf. von aktiven Bakterien stammen könnten. Eine sichere Identifikation ist auf Grund der Überstrahlung und des oftmals nicht in allen drei Filtern nachweisbaren Signals bisher nicht möglich.

Die CLSM-Mikroskopie erlaubt es Fluoreszenzaufnahmen in sog. Stacks (Stapeln) zu machen, die eine dreidimensionale Auswertung von Signalen ermöglicht. Dabei wurden erste Anzeichen für Signale, die ihren Ursprung unterhalb der Kristallfläche zu haben schienen, deutlich. Es bestehen somit die Möglichkeit, dass entweder Fehler im Kristall eine entsprechende Emission verursachten, das Sonden/ Farbstoff durch Risse in die Tiefe gelangten und deshalb nicht in den Waschschritten entfernt werden konnten, oder dass hier tatsächlich Bakterien in einer Kavität detektierbar waren [Abb. 5.28 Bildteil C]. Die stark amorphe Umgebung wäre eine potentiell gute Umgebung für unspezifische Signale.

Ein weiteres Problem ergibt sich bei der Interpretation der Fluoreszenzsignale die von Kristallen nach der Inkubation in peruanischem Sediment gemacht wurden [Abb. 5.17]. Hybridisierungssignale mit der allgemeinen Bakteriensonde und der speziellen *Shewanella*-Sonde konnten detektiert, aber nicht durch die DAPI-Färbung bestätigt werden. Es muss daher davon ausgegangen werden, dass es sich bei den Signalen um ein Artefakt handelt.

Für zukünftige Ansätze empfiehlt sich neben dem Einsatz von Sonden gegen weitere Eisenreduzierer auch die Nutzung von archaellen Sonden. Durch die Kombination verschiedener Sonden könnte so die Identifikation der silikatverwitternden Bakterien deutlich vorangetrieben werden.

7 Methodendiskussion

In diesem Kapitel liegt der Fokus auf den verwendeten Setups, sowie den begleitenden Protokollen. Im Kontext der soeben diskutierten Daten werden diese Systeme evaluiert. Vorschläge für Variationen werden vorgestellt.

7.1 Inkubationssystem

Für periodische Beprobungen, sowie Detektion von nur geringen metabolischen Umsatzraten in einem anaeroben System haben sich die zuerst genutzten Inkubationsgefäße nicht bewährt. Wie bereits eingangs erwähnt, wurden hier ein starker Gasaustausch zwischen Gefäßinhalt und Atmosphäre detektiert. Bereits das einmalige Durchstechen der Septen beschleunigte diesen Prozess deutlich. Durch das Umsetzten der Proben in Borosilikatflaschen mit Butylstopfen wurde ein Gasaustausch unterbunden. Ein Problem ergibt sich aus der Interaktion zwischen dem Borosilikatglas und den Proben. Ein Silikateintrag in die Proben durch Reaktionen mit dem Glas können nicht ausgeschlossen werden. Die Nutzung von chemisch resistenten Kunststoffeinsätzen wäre empfehlenswert. Zudem muss auf das Verhältnis zwischen Grundfläche der Borosilikatflaschen und Volumen des *Slurries* geachtet werden. Nachdem die *Slurries* für die Inlays der ersten Inkubationsgefäße ausgelegt waren ergab sich beim Umfüllen in die größeren Borosilikatflaschen das Problem, dass der nach Absetzten des Sediments überstehende klare Medienstand sehr gering war und für die analytische Beprobung den Einsatz von Spritzenvorsatzfiltern notwendig machte.
Für die Silikatverwitterung ist die frei Silikatkonzentration eine der entscheidenen Proxys. Während der Analysen und Inkubationen ist daher darauf zu achten keinerlei Glasgeräte zu nutzen. Für die ICP-MS-Analysen wurde daher vollständig auf mit 1%iger HNO_3 gespülten Teflongefäße bzw. Kunststoffgeräte zurückgegriffen. Eine Adaption auf das Inkubationssystem ist unrealistisch und teuer, würde aber bei z.B. der Innenbeschichtung von Flaschen gleichzeitig den Störlichteintrag verringern. Eine Abdunkelung der Gefäße wäre gerade bei phototrophen Mikroorganismen von Interesse kann aber auch mit schwarzer Folie erreicht werden.
Durchaus aufwendiger und kostenintensiver wäre ein Inkubationssystem, dass die Simulation von *in situ*-Bedingungen im Bezug auf Druckverhältnisse ermöglicht. Da chemische und biochemische Prozesse von Druck und Temperatur kontrolliert werden, sind beide Parameter kritisch für eine Simulation der *in situ*-Bedingungen [Bartlett, 2002; Kasahara *et al.*, 2009]. Während ein

Temperaturregime leicht eingestellt werden kann, ist das Einstellen von hydrostatischen Drücken ungleich schwieriger. Beobachtete Reaktionen können einen hieraus resultierenden Fehler enthalten.

Eine längere Inkubationsdauer der Silikate in den Borosilikatflaschen würde die Ergebnisse noch verdeutlichen, aber den zeitlichen Rahmen der Diplomarbeit sprengen [Bennett, 2001]. Eine *in situ*-Inkubation der Silikate ist auf Grund der schwer zugänglichen Probenorte, sowie der Sedimenttiefe zum gegenwärtigen Zeitpunkt fast ausgeschlossen. Für zukünftige Ansätze ist daher eine längere Inkubation von mindestens 90 Tagen in den Mikrokosmen wünschenswert. Im Falle der Okinawasedimente zeichnete sich zum Ende der Inkubationszeit ein erster Anstieg der Metabolitenraten ab, ohne dass dieser innerhalb des Inkubationszeitraums noch nachweisbar wurde.

7.1.1 Sedimente

Die Ausgangssedimente waren nach ihrer Probennahme vor Ort sehr unterschiedlichen Bedingungen ausgesetzt. Während die Proben aus Okinawa und Peru in gasdicht verschlossenen Borosilikatflaschen unter original Seewasser bei *in situ*-Temperatur in Dunkelheit gelagert wurden, wurden die Proben aus dem Sakhalin Trog in einem Kernlager aerob bei 4°C eingelagert. Bei *ex situ* gelagerten Kernen besteht die Gefahr, dass sie, während der in diesem Fall fünfjährigen Lagerzeit, einen Regimeshift durchlaufen und nicht mehr repräsentativ für das ursprüngliche Habitat sind. Strikte Anaerobier, wie z.B. diazotrophe Organismen wären durch die aerobe Lagerung ausgeschlossen worden. Organismen die nicht in der Lage waren resistente Dauersporen gegen Austrocknung zu bilden hätten ebenfalls deutlichen Schaden nehmen können. Zusätzlich ist eine Kontamination mit Pilzsporen, Umweltbakterien oder vergleichbaren Organismen bei einer offenen aeroben *ex situ*-Lagerung nicht ausgeschlossen.

7.1.2 Medien

Der hier verwendete Sauerstoffindikator Resazurin wird für die Anwendung nur als bedingt brauchbar eingestuft. In den Standardmedienrezepten sorgen Vitaminlösungen für ein stärker reduziertes Milieu, dass eine größere Sauerstofftoleranz zur Folge hat. Die hier verwendeten Mangelmedien haben dieses Potential nur in geringerem Ausmaß. Mikrosensorenmessungen an den vorliegenden Medien haben ergeben, dass der Umschlagspunkt des Indikators bei > 0,1 µM O_2 liegt. Dieses Ergebnis liegt deutlich unter den, in der hier verwendeten Anaerobierbox, erreichbaren Werten.

Die ermittelte Komposition der Elemente im Seewasser weicht gerade in den hydrothermal beeinflussten Gebieten wie Okinawa [Inagaki *et al.*, 2006] von *in situ*-Bedingungen ab. Eine Anpassung des Mediums kann hier unerwünschte Nebeneffekte verringern. Ausgehend von der Hypothese, dass Silikatverwitterung als Quelle für limitiere Nährstoffe dient, wäre die weitere Reduktion von P-Quellen in dem Medium zur Beschleunigung der Verwitterung denkbar.

7.1.3 Beprobung

Die Beprobung via dreifach mit N_2 gespülter Spritzen ist soweit tauglich, es empfiehlt sich allerdings einen mit Luerlock versehenen Hahn einzubauen. Das zu entnehmende Volumen bzw. der Totraum wird dadurch um etwa 0,1 ml größer, die Genauigkeit und vor allem Sicherheit bei Systemen unter Druck deutlich höher. Für die Silikatinkubation bietet es sich an die Silikate, statt wie in diesem Fall, direkt in den *Slurry* zu geben mit einem Epoxidharz auf kleine Objektträger für die CARD-FISH Analysen zu fixieren.

7.1.4 Düngung

Für die Düngung wurde wie oben beschrieben 15 mM NaAc eingesetzt. Hierdurch wurden vor Allem Sulfatreduzierer begünstigt, eine alternative Zugabe von Methanol könnte sich zu Gunsten der Methanogenen auswirken [Oremland and Polcin, 1982]. In der vorliegenden Arbeit wurde bewusst auf die Zugabe von verschiedenen Stoffen verzichtet um einen artifiziellen *community shift* zu vermeiden.

7.1.5 Analysemethoden

CH_4 und CO_2

Eine parallele Detektion von CH_4 und CO_2 mittels Gaschromatographen wäre hilfreich. So würde zum Einen gekoppelte Stoffkreisläufe wesentlich besser detektierbar, zum Anderen wäre die Kontaminationsgefahr bei der Beprobung geringer. In den Chromatogrammen der Methanmessungen traten immer wieder kleinere Peaks auf, die nicht quantitativ erfasst und analysiert werden konnten.

Wie die Graphen zur CO_2-Entwicklung zeigten, war die initiale CO_2-Konzentration deutlich geringer als angenommen [Abb. 5.4]. Die Mikrokosmen wurden unter einer CO_2/ N_2-Schutzatmosphäre abgefüllt. Der CO_2-Gehalt hätte theoretisch bei 20 % liegen sollen, bereits am ersten Messpunkt wurden jedoch maximal 17 % detektiert. Die mit CO_2 aufgetoppten Okinawaproben zeigten Ein-

stiegswerte von etwa 60% bei einem Überdruck von 1 bar [Abb. 5.4 Bildteil D]. Um diese Werte zu erhöhen und somit auch den pH-Werte weiter zu senken, wäre eine längere Spülung des Gasraums mit CO_2 notwendig.

Eisen

Eine einstündige Eisenextraktion mit 5ml 1 M HCl erwies sich als ausreichend für die vergleichsweise geringen Sedimentvolumen von 0,1 ml. Der Einsatz von mehr Sediment unter einer entsprechende Anpassung der Reagenzvolumina hätte eine größere Sicherheit bei den gemessenen Trockengewichten bedeutet. Zudem hätte das Ansetzten von parallelen Inkubationen eine statistisch abgesicherte Konzentrationsentwicklung der Eisenspezies ermöglicht. Auf beide Methoden musste auf Grund der geringen verfügbaren Sedimentmenge pro Mikrokosmos verzichtet werde.

7.2 16S rDNA-Analyse

Die phylogenetische Analyse wird maßgeblich von der Effizienz der Zelllyse, der DNA-Isolierung sowie selektiven Amplifikation der 16S rRNA-Gene während der PCR beeinflusst. Die ermittelten Sequenzen entsprechen daher weder in ihrer Abundanz noch ihrer Diversität zwangsläufig den Habitatbedinungen. Grundsätzlich besteht die Möglichkeit, dass einige Bakterien oder Archaeen durch die Isolierungsprotokolle nicht erfasst wurden [von Wintzingerode *et al.*, 1997]. Gerade Extremophile könnten Dauerstadien oder mechanische Barrieren besitzen, die eine DNA-Isolierung erschweren. In diesem Fall könnte das Protokoll um einen thermischen Aufschluss oder alkalische Lyse [Birnboim and Doly, 1979] erweitert werden. Zudem werden nicht alle 16S rRNA-Gene mit den universellen Primern amplifiziert [le Roux *et al.*, 2004]. Da die Detektierbarkeit von DNA-Produkten antiparallel zu ihrer Größe ist, kleiner Fragmente also eher amplifiziert werden, besteht generell die Möglichkeit einer verzerrten Darstellung [Kleter *et al.*, 1998]. Für eine statistisch sichere Auswertung wäre eine deutlich größere Anzahl von Sequenzierungen notwendig [le Roux *et al.*, 2004]. Der Einsatz zusätzlicher molekularer Ansätze zur weiteren Differenzierung der mikrobiellen Gemeinschaften , wie z.B. ein erweiterter Primersatz sowie Denaturierende-Gradientengel-Elektrophorese [Webster *et al.*, 2006] sei für zukünftige Ansätze angeraten.

7.3 CARD-FISH

Wie die Ergebnisse der CARD-FISH Analyse zeigen ist das Protokoll für eine Doppelhybridisierung auf Silikaten noch nicht endgültig optimiert. Für die Analyse gilt allgemein, dass bei der

Inkubation möglichst glatte Kristalle eingesetzt werden sollten. Bei der Mikroskopie in Cittifluor und Immersionsöl ergeben sich durch sehr asymmertrische Kristalle einige technische Probleme. Hier muss ein Kompromiss zwischen Oberflächenbeschaffenheit und Habitat für Mikroorganismen gefunden werden. Die Ergebnisse haben gezeigt, dass sich Mikroorganismen in Kristallecken und Rissen besonders gut. Nach der Inkubation in den Mikrokosmen kann die Dauer der Formalinfixierung verlängert werden. Bei Proben, die ggf. eine geringe Zellzahl bereithalten, wäre es in Erwägung zu ziehen die Agaroselösung zur Fixierung in höherer Konzentration einzusetzen. Die bisher verwendeten 0,2%igen Lösungen eignen sich nachweislich gut für Filter-Analysen tragen aber der schwierigen Topographie der Kristalle nur bedingt Rechnung [Pernthaler *et al.*, 2002]. Es besteht die Gefahr, dass sich in den zahlreichen folgenden Waschschritten wieder Zellen lösen. Sollte eine höhere Agarosekonzentration gewählt werden, muss das Permeabilisierungsprotokoll angepasst werden. Hierzu zählt auch die optionale Kombination mehrerer Enzyme z.B. Lysozym und Achromopeptidase [Sekar *et al.*, 2003]. Um eine zusätzliche Artefaktbildung zu verhindern, sollten bei einer Doppelhybridisierung die Wachvorgänge angepasst werden. Es empfiehlt sich die Waschschritte im ersten Durchlauf deutlich zu verkürzen, dafür im zweiten Durchgang umso länger zu waschen. Sollte auch dieses nicht u den gewünschten Effekten führen kann die Menge des Farbstoffs, oder ggf. sogar der Sonde verringert werden. Bei der anschließenden Epifluoreszenzmikroskopie empfiehlt es sich mit einem 16x Objektiv zu arbeiten. Die Vergrößerung ist vorerst ausreichend um die Signale zu erkennen, trotzdem bleibt die Tiefenschärfe weitesgehend erhalten. Letzteres ist auf Grund der Oberflächenbeschaffenheit der Kristalle sehr hilfreich um kleinere Höhenunterschiede oder Unebenheiten auszugleichen.

Parallel zu der CARD-FISH-Analyse könnte ein quantitativer-PCR-Ansatz gewählt werden. Mit geeigneten Primern ließe sich so überprüfen, ob entsprechende Spezies vertreten sind. Ein quantitatives-PCR-Protokoll, das die Zellen auf Silikaten nachweist, bedürfte allerdings erheblichen Modifikationen um z.B der Eigenfluoreszenz des Kristalls bzw. der Abschirmung von Signalen durch selbigen Rechnung zu tragen. Sinnvoller wäre die PCR an silikatfreien Bakterien durchzuführen.

7.4 REM

Die Auflösung des zur Verfügung stehenden REMs ist nicht vollständig nutzbar. Bis zu einem Maßstab von 1 µm lassen sich leidlich scharfe Aufnahmen machen, eine Auflösung im Nanometer-Bereich ist nur unter massiven Qualitätsverlusten möglich. Somit ist lediglich eine sehr grobe mor-

phologische Einordnung der Bakterien möglich. Beschriebene Strukturen wie *Nanowires*, die bei *Shewanella* unter O_2-Mangel gebildet werde [Gorby *et al.*, 2009], waren nicht detektierbar. Auch für diese Art der Mikroskopie empfiehlt es sich eine plane Ebene des Kristalls für den Elektronenstrahl zugänglich zu machen. Der Probenteller kann nicht angewinkelt werden, sodass oftmals Schatten entstehen in denen das Bild nur schlecht aufgelöst und sehr dunkel erscheint.
Ein weiterer kritischer Faktor ist die Dicke der aufgetragenen Goldschicht. Die Bilder für die Peruproben wurden laut Arbeitsvorschrift der Zentralen Mikroskopie der CAU bedampft. Hierbei wird eine relativ dicke Schicht appliziert, die zwar gute Reflektionen bietet, aber Feinststrukturen abdeckt. Den anderen Proben wurde lediglich eine wenige µm dicke Schicht zugestanden. Die Mikroskopieergebnisse waren nicht schlechter, ermöglichten eine feinere Strukturanalyse, produzieren aber in sehr schlecht zugänglichen Bereichen teilweise leichte Schatten.
Gleichzeitig wäre eine Energiedispersive Röntgenspektroskopie-Einheit von großem Nutzen. Hiermit könnten die oben gezeigten und benannten amorphen Strukturen auf ihre chemische Zusammensatzung untersucht werden [Abb. 5.24 Bildteil F]. Somit ließe sich aufklären, ob es sich um z.B. eine Carbonatstruktur handelt, die als Endprodukt mikrobieller Metabolismen beschrieben sind. Solche Carbonatpräzipitate wären zur Erfüllung der eingangs angeführten potentiellen Reaktionsgleichung der Silikatverwitterung unerlässlich und ein weiteres Indiz für eine solche Reaktion. Zudem könnte es von Vorteil sein Dünnschnitte nach [Barker and Banfield, 1996] von den Oberflächen der Kristalle anzufertigen. Eine Mikroskopie wäre somit einfacher und das Eindringen der Mikroorganismen in den Kristall quantifizierbar.

7.5 Technische Bewertung

Im Bereich der technischen Umsetzung von anoxischen Inkubationsexperimenten konnten während der Experimentalphase wertvolle Erkenntnisse für zukünftige Ansätze gewonnen werden. Der Aufbau und die Überwachung der Werte während der Inkubationsphase wurden über den Inkubationszeitraum optimiert. Vorschläge für neue Ansätze leiten sich daraus ab. Ein Hauptnachteil des hier beschriebenen Setups liegt in der eigentlichen Probengröße, sowie dem benötigten Volumen für die einzelnen Proben. Idealerweise würden die Proben ein größeres *Slurry*volumen umfassen, um Verdünnungseffekte durch die Probennahme zu minimieren. In dem vorliegende System wurde über den gesamten Inkubationszeitraum das Medienvolumen fast komplett ausgetauscht. Ein durchgehendes ICP-MS basierendes Profil über die Gesamtzeit wäre sicherlich wünschenswert gewesen. Die hier gewonnene Eckdaten gewähren einen ersten Einblick in die Entwicklung

der einzelnen Elementkonzentrationen. Zusätzlich wäre mindestens ein reales Replikat für jede Probe notwendig um eine statistische Absicherung der Messwerte zu ermöglichen. Idealerweise würden zukünftige Inkubationen dabei auf ein System zurückgreifen bei dem alle Parameter parallel aus einem Ansatz gemessen werden könnten. Dabei stellt sich die Schwierigkeit, dass z.B. Sedimentproben für die Eisenmessung entnommen werden müssen, ohne dass die Gasphase der Probe verloren geht. Arbeiten in der Anaerobierbox wären demnach ebenso wenig geeignet, wie die Entnahme von Sedimenten durch sehr dicke Kanülen.
Für zukünftige Versuche ist es sicherlich sinnvoll Analysen auf Sedimentproben zu konzentrieren die nach der Probennahme vor Ort möglichst in *in situ*-Bedingungen über ein möglichst kurze Zeit gelagert wurden. Die relativ alten und aus mikrobiologischer Sicht vollständig *ex situ* gelagerten Proben haben in der vorliegenden Arbeit auch die schlechtesten Ergebnisse geliefert. Zudem kann bereits eine kurze Lagerzeit *ex situ* die mikrobielle Gemeinschaft deutlich verändern [Rochelle *et al.*, 1994]. Somit kann neben der erschwerten Detektierbarkeit auch die Veränderung der mikrobiellen Gemeinschaft (*regime shift*) nicht ausgeschlossen werden. Da zudem auf Grund von Zeit- und Ressourcenlimitationen keine Sedimenthorizonte, sondern Stichproben analysiert werden, konnten die Ergebnisse den sonst dynamischen Vorgängen im Sediment nicht gerecht werden.

7.6 Abschlussbetrachtung

Die Experimente der vorliegenden Diplomarbeit wurden auf den Nachweis und die Darstellung von mikrobiellem Einfluss auf die Silikatverwitterung in marinen Sedimenten ausgerichtet. Es wurden starke Indizien für eine mikrobielle Silikatverwitterung festgestellt. Einen endgültigen quantitativen Nachweis für einzelne mikrobielle Spezies steht noch aus. Die Arbeiten deuten an, dass die Integrität von Silikaten durch das mikrobiell medierte Herauslösen von Nährstoffen aus dem Kristallgitter zu Auflösungserscheinungen und sekundären Präzipitationen führen könnten. Molekulare Ansätze zur weiteren Differenzierung der mikrobiellen Gemeinschaften [Webster *et al.*, 2006], in Kombination mit dem Potential von CARD-FISH-Analysen, sowie modifizierte Inkubationsexperimente mit sedimentfreien Reinkulturen stellen hier hilfreiche Ansätze für weitere Forschung dar.

8 Perspektiven

Im Folgenden wird ein Überblick über mögliche zukünftige Forschungsansätze gegeben.

Inkubationssystem

In der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Treude wird gerade eine Kern-Durchflussanlage entwickelt, die es ermöglicht Gasflüsse durch Sedimentkerne zu simulieren. Eine entsprechende Anwendung auf die Simulation von mikrobieller Silikatverwitterung wäre interessant. In einem solchen dynamischen System können mehrere *in situ*-Parameter wie Methanfluss oder Redoxzustände im Sediment nachgestellt werden. Ein längerer Inkubationszeitraum in den Mikrokosmen zusammen mit einer intervallartigen Entnahme von Silikatproben kann detaillierte Aufschlüsse über die Entwicklung von Silikatverwitterung geben [Bennett *et al.*, 2001]. Die Verwitterungsreaktionen wären so weitaus besser quantifizierbar und könnten eine Bestimmung der Kinetik der Verwitterung ermöglichen. Ein Inkubationsexperiment von Festmedien mit Tiefseesedimenten bei unterschiedlichen Temperaturen zeigte ein deutlich verbessertes mikrobielles Wachstum bei erhöhten Temperaturen [Inagaki *et al.*, 2003]. Durch eine solche Anzucht würde zwar von *in situ*-Bedingungen abgewichen werden, Mikroorganismen mit einer langen Generationszeit könnten aber besser untersucht werden. Die gezielte Anzucht von potentiell silikatverwitternden Kulturen kann dann Rückschlüsse auf die Vorgänge unter Habitatbedingungen ermöglichen.

Reinkultur

Im Zuge dieser Diplomarbeit wurde Silikatverwitterung in Umweltproben analysiert. Für die zweifelsfreie Identifikation von mikrobieller Silikatverwitterung wären Experimente mit Reinkulturen von großem Interesse. Durch faktorielle Studien im Bereich von Substratzugabe, pH, Silikatzusammensetzung, Liganden und weiteren kritischen Parametern wäre eine quantitative Analyse der Silikatverwitterung möglich. In diesem Zuge könnte ein weiteres Augenmerk auf putative Exoenzyme oder bioaktive extrazelluläre Polysaccharide gelegt werden [Barker *et al.*, 1998].

quantitative PCR

Neben der molekularen Analyse per Sequenzierung und CARD-FISH kommt eine quantitativen PCR für zukünftige Experimente in Betracht. Für molekulare Analysen könnten Mikroorganismen unter sonst silikatfreien und nährstofflimitierten Bedingungen mit Silikaten geködert werden. Nach einer Inkubation könnten die Mikroorganismen per Ultraschall von den Silikaten gelöst

und entsprechend der Methode weiter prozessiert werden. Hierdurch könnten indirekt Mikroben-Mineral-Interaktionen charakterisiert werden.

Silikate

Eine Option wäre Poly-L-Lysin und Laminin beschichtete Kristalle in das Sedimente einzubringen. So würde zwar ein artifizieller Biofilm geschaffen, der sich allerdings, sofern er die unterliegenden Silikate effektiv verwittert, als Untersuchungsobjekt für technische CO_2-Sequestrierungsansätze eignen würde.

Kombinationsanalysen

Eine Kombination von Fluoreszenzmikroskopie und REM-Analyse wäre denkbar. Fixierte Proben könnten erst einer CARD-FISH-Analyse und schließlich einer Rasterelektronenmikroskopie unterworfen werden. Aus dem Vergleich der Daten wären Rückschlüsse auf das Verwitterungsverhalten identifizierter Mikroorganismen möglich. Eine weitere Analysemöglichkeit, die eigentlich funktionell an ein REM gekoppelt ist, wären Energiedispersive Röntgenspektroskopie-Analysen (EDX). Mittels EDX und Sekundärionen-Massenspektrometrie könnten zum Einen sekundäre Strukturen auf den Kristallen aufgeklärt werden, zum Anderen bevorzugt besiedelte Flächen auf den Kristallen auf ihre geochemische Besonderheit hin analysiert werden.

Stabile Isotopenanalyse

Zuletzt sei auf die Analyse der Isotopenfraktionierung hingewiesen. Hierdurch könnten Reaktionen deutlich in biogeochemisch und geochemisch unterschieden werden. Biologische Metabolite wären deutlich an ^{12}C angereichert.

9 Anhang

9.1 Abkürzungsverzeichnis

Im Nachfolgenden befindet sich eine Liste der wichtigsten Abkürzungen, Elementsymbole entsprechend des PSE werden nicht aufgeführt.

AOM	anaeroben Oxidation von Methan
BIGO	Biogeochemical Observatory
bp	Basenpaare
BSA	Bovine serum albumine
CARD-FISH	catalyzed reporter deposition fluorescence in situ hybridization
CAU	Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
CLSM	konfokale Laser-Raster-Mikroskopie
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
DEP	DNA-Extraktionpuffer
DES	DNase/ pyrogenfreies Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DMSO	Dimethylsulfoxid
DOC	dissolved organic carbon
DSHG	Deep Sea Hydrothermal Vent Group
EDV	Elektronische Datenverarbeitung
EtOH	Ethanol
FID	Flammenionisationsdetektor
g	Gramm
GC	Gaschromatograph
HCl	Salzsäure
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-Ethansulfonsäure
HNLC	high-nutrient-low-chlorophyll
HPLC	High-Pressure-Liquid-Chromatography
IAPSO	International Association for the Physical Sciences of the Oceans
ICP-MS	inductively-coupled-plasma mass-spectrometry
ICP-OES	inductively coupled plasma optical emission spectrometry
IfAM	Institut für Allgemeine Mikrobiologie an der Universität zu Kiel
IFM-GEOMAR	Leibniz-Institut für Meereswissenschaften an der Universität Kiel
IPCC	Intergovernmental Panel on Climate Change
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
kW	Kilowatt
m	Masse
M	Molar
MHz	Megahertz
mM	millimolar
µm	Mikrometer
µM	mikromolar
MPI Bremen	Max-Planck-Institut für Marine Mikrobiologie in Bremen
ms	Millisekunde
MW	Molekulargewicht
NaAc	Natriumacetat

nm	Nanometer
OMZ	Oxygen Minimum Zone
PCR	Polymerasekettenreaktion
pH	negativ dekadischer Logarithmus der Hydroniumionenkonzentration
PMF	protom motive force
pmol	picomol
ppb	parts per billion
ppm	parts per million
REM	Rasterelektronenmikroskop
RI	refractive index
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
S	Salinität
SDS	Sodiumdodecylsulfate, dt. Natriumlaurylsulfat
S MG	Proben aus der Methanogenenzone des Sakhalintroges
SRR	Sulfatreduzierungsrate
S SR	Proben aus der Sulfatreduzierungszone des Sakhalintroges
Tmol	Terramol
TW	Trockengewicht
UV/Vis	ultraviolettes und sichtbares Licht
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid
z	Ladungszahl

9.2 Chemikaliennachweis

Im Folgenden findet sich eine Auflistung der wichtigsten Chemikalien samt ihrem Hersteller, bzw. Lieferanten.

Chemikalien	Firma (Firmensitz)
4-Hydroxy-5-methyl-3-furanone	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Achromopeptidase	Sigma-Aldrich (München)
Agar-Agar	Roth (Karlsruhe)
Agarose	Invitrogen (Karlsruhe)
Ammoniumchlorid	Roth (Karlsruhe)
Ampicillin	Gerbu (Gaiberg)
Assurance Al-Standard 10000 ppm	Spex Centri Prep (Metuchen, USA)
Assurance Fe-Standard 10000 ppm	Spex Centri Prep (Metuchen, USA)
Assurance Mn-Standard 1000 ppm	Spex Centri Prep (Metuchen, USA)
Bromphenolblau	Serva (Heidelberg)
Bytownit	Jentsch Rohsteine-Mineralien (Extertal)
Calciumchlorid-Dihydrat	VWR (Darmstadt)
Chloramphenicol	Gerbu (Gaiberg)
Chloroform	Roth (Karlsruhe)
$CuSO_4 \cdot 5\,H_2O$	Roth (Karlsruhe)
DAPI	Roth (Karlsruhe)
Dextransulfat	Roth (Karlsruhe)
di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Roth (Karlsruhe)
EDTA	Roth (Karlsruhe)

Chemikalien	Firma (Firmensitz)
Eisen(II)-sulfat-Heptahydrat	Roth (Karlsruhe)
Essigsäure	Roth (Karlsruhe)
Ethanol 70%ig	Roth (Karlsruhe)
Ethanol 96%ig, vergällt	Roth (Karlsruhe)
Ethidiumbromid	Roth (Karlsruhe)
Ferrospectral	Merck (Darmstadt)
Formamid	Roth (Karlsruhe)
Glutardialdehyd	Roth (Karlsruhe)
Glycerin	Merck (Darmstadt)
Glycogen	Fermentas (St. Leon-Rot)
Gycerin	Roth (Karlsruhe)
Hefeextrakt	Roth (Karlsruhe)
HEPES	Roth (Karlsruhe)
IPTG	Gerbu (Gaiberg)
Isoamylalkohol	Roth (Karlsruhe)
Isopropanol	Roth (Karlsruhe)
Kaliumacetat	Merck (Darmstadt)
Kaliumbromid	VWR (Darmstadt)
Kaliumchlorid	Merck (Darmstadt)
Kaliumdihydrogenphosphat	Roth (Karlsruhe)
Kanamycin	Gerbu (Gaiberg)
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	Roth (Karlsruhe)
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	Roth (Karlsruhe)
Maleinsäure	Roth (Karlsruhe)
N-(β-Ketocaroyl)-L-homoserinlakton	Sigma-Aldrich (Steinheim)
$Na_2MoO_2 \cdot 2\,H_2O$	Roth (Karlsruhe)
Natrium Cacodylat	Diagonal (Münster)
Natriumacetat	Roth (Karlsruhe)
Natriumcarbonat	Roth (Karlsruhe)
Natriumchlorid	Roth (Karlsruhe)
Natriumhydrogencarbonat	Roth (Karlsruhe)
Orthoklas	Jentsch Rohsteine-Mineralien (Extertal)
Osmiumtetroxid	Roth (Karlsruhe)
Paraformaldehyd	Roth (Karlsruhe)
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol	Roth (Karlsruhe)
Resazurin	Sigma-Aldrich (München)
Salzsäure, 12 M	Roth (Karlsruhe)
Sodium-Dodecyl-Sulfat	Roth (Karlsruhe)
TRIS	Roth (Karlsruhe)
Triton X 100	Roth (Karlsruhe)
Trypton	Roth (Karlsruhe)
Wasserstoffperoxid	Roth (Karlsruhe)
X-Gal	Gerbu (Gaiberg)
Zinkchlorid	VWR (Darmstadt)
$ZnSO_4 \cdot 7\,H_2O$	Roth (Karlsruhe)

9.3 Enzyme und Kits

Name	Firma (Firmensitz)
FastDNA Spinkit for soil 11-6560-200	MP (Solon, USA)
GoTaq DNA Polymerase	Promega (Mannheim)
Lysozym	Roth (Karlsruhe)
NucleoSpin Extract II	Macherey-Nagel (Düren)
ProteinaseK	Fermentas (St. Leon-Rot)
RNase A	Qiagen (Hilden)
Soil DNA Kit D5625-00 E.Z.N.AK	Omega bio-tek (Norcross, USA)
TOPO TA Cloning	Invitrogen (Karlsruhe)

9.4 Gerätenachweis

In der folgenden Tabelle werden Geräte und Laborgeschirr aufgeführt. Alle Marken sind Eigentum der entsprechenden Firmen, eingetragenen Warenzeichen wurden nicht besonders markiert.

Gerät (Verwendung)	Firma (Firmensitz)
2000 GenoGrinder (Sedimentaufbereitung)	C3 GmbH (Haar)
6 FT Poropak Q (GC Säule für CH_4)	Agilent (Santa Clara, USA)
Agilent 7500 (ICP-MS)	Agilent (Santa Clara, USA)
Aminex HPX-87H 300*7,8 mm (HPLC-Trennsäule)	Bio-Rad (München)
Anionen neutral 4*20 mm (HPLC-Vorsäule)	Sykam (Eresing)
Borosilikatflaschen (Equilibrierungsphase)	Schott (Wertheim)
Borosilikatflaschen (Mikrokosmen)	LMS-Consult (Brigachtal)
Braunglasvials (HPLC-Analyse)	VWR (Darmstadt)
Centrifuge5804 R (Laborzentrifuge)	Eppendorf (Wesseling-Berzdorf)
DSM 940 TEM (Elektronenmikroskopie)	Zeiss (Oberkochen)
EPS 200 (Gelelektrophorese)	Pharmacia Biotech (Freiburg)
ERC-7515A RI und UVIS 204 (HPLC-Detektoren)	Sykam GmbH (Eresing)
Hitachi U-280 OA (Photometrie)	Hitachi Chemical Co., Ltd. (Japan)
HP5890 Series II (Gaschromatograph)	HP (Palo Alto, USA)
IChem SeptaJars (Mikrokosmen)	Kleinfeld Labortechnik (Gehrden)
Inkubater 7601 (CARD-FISH)	GFL (Burgwedel)
K5501 digitalIKA (Eisenextraktion)	IKA (Staufe)
Lab850 pH-meter (Medien)	Schütt (Göttingen)
Leica DMRE (CLSM)	Leica Microsystems GmbH (Wetzlar)
Leitz Aristoplan (Fluoreszenzmikroskop)	Olympus (Hamburg)
MR Hei-Tec (Heiz- und Rührplatte)	Heidolph (Schwabach)
Nanodrop 2000 (DNA Analyse)	Thermo-Fisher(Waltham, USA)
Poly-Vials (div.) (Probenarchiv)	Zinsser Analytic (Frankfurt)
Power Pac 300 (Gelelektrophorese)	BIO-RAD (München)
Rotilabo-Probendose (Einsätze für für SeptaJars)	Roth (Karlsruhe)
Spritzenvorsatzfilter 0,2µm (Probenaufbereitung)	Whatman (Maidstone, UK)
Sykam HPLC (HPLC)	Sykam GmbH (Eresing)
Thermocycler PTC 220 (PCR)	MJ Research()
UVmini 1240 (UV-Vis Spektrophotometer)	Shimadzu (Duisburg)
Vortex Genius 3 (Vortexen)	IKA (Staufe)

10 Literaturverzeichnis

Abraham, W.-R., Strompl, C., Meyer, H., Lindholst, S., Moore, E. R. B., Christ, R., Vancanneyt, M., Tindall, B. J., Bennasar, A., Smit, J., and Tesar, M. (1999). Phylogeny and polyphasic taxonomy of caulobacter species. proposal of maricaulis gen. nov. with maricaulis maris (poindexter) comb. nov. as the type species, and emended description of the genera brevundimonas and caulobacter. Int J Syst Bacteriol, *49* 1053-1073.

Amann, R. I., Binder, B. J., Olson, R. J., Chisholm, S. W., Devereux, R., and Stahl, D. A. (1990). Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. Appl Environ Microbiol, *56* 1919-1925.

Banning, E. (2006). Developing methods to visualize microbe and mineral interactions during seafloor weathering. unpublished data.

Barker, W. W. and Banfield, J. F. (1996). Biologically versus inorganically mediated weathering reactions: relationships between minerals and extracellular microbial polymers in lithobiontic communities. Chemical Geology, *132* 55 - 69. Chemical And Biological Control On Mineral Growth And Dissolution Kinetics, American Chemical Society Meeting.

Barker, W. W., Welch, S. A., Chu, S., and Banfield, J. F. (1998). Experimental observations of the effects of bacteria on aluminosilicate weathering. American Mineralogist, *83* 1551-1563.

Barns, S. M., Takala, S. L., and Kuske, C. R. (1999). Wide distribution and diversity of members of the bacterial kingdom acidobacterium in the environment. Applied and Environmental Microbiology, *65* 1731-1737.

Bartlett, D. H. (2002). Pressure effects on in vivo microbial processes. Biochimica Et Biophysica Acta-protein Structure and Molecular Enzymology, *1595* 367-381.

Behnke, A., Bunge, J., Barger, K., Breiner, H.-W., Alla, V., and Stoeck, T. (2006). Microeukaryote community patterns along an O_2/H_2S gradient in a supersulfidic anoxic fjord (framvaren, norway). Appl. Environ. Microbiol., *72* 3626-3636.

Bennett, P. C., Rogers, J. R., Choi,W. J., and Hiebert, F. K. (2001). Silicates, silicate weathering, and microbial ecology. Geomicrobiology Journal, *18* 3-19.

Berlin, D. L., Herson, D. S., Hicks, D. T., and Hoover, D. G. (1999). Response of Pathogenic Vibrio Species to High Hydrostatic Pressure. Appl. Environ. Microbiol., *65* 2776-2780.

Berner, R. A., Lasaga, A. C., and Garrels, R. M. (1983). The carbonatesilicate geochemical cycle and its effect on atmospheric carbon-dioxide over the past 100 million years. American Journal of Science, *283* 641-683.

Bertani, G. (1951). Studies on lysogenesis I: The mode of phage liberation by lysogenic escherichia coli. J. Bacteriol., *62* 293-300.

Biddle, J. F., Lipp, J. S., Lever, M. A., Lloyd, K. G., Sorensen, K. B., Anderson, R., Fredricks, H. F., Elvert, M., Kelly, T. J., Schrag, D. P., Sogin, M. L., Brenchley, J. E., Teske, A., House, C. H., and Hinrichs, K. U. 2006). Heterotrophic archaea dominate sedimentary subsurface ecosystems off peru. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, *103* 3846-3851.

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

Bretschger, O., Obraztsova, A., Sturm, C. A., Chang, I. S., Gorby, Y. A., Reed, S. B., Culley, D. E., Reardon, C. L., Barua, S., Romine, M. F., Zhou, J., Beliaev, A. S., Bouhenni, R., Saffarini, D., Mansfeld, F., Kim, B. H., Fredrickson, J. K., and Nealson, K. H. (2007). Current production and metal oxide reduction by shewanella oneidensis MR-1 wild type and mutants. Applied and Environmental Microbiology, *73* 7003-7012.

Brinkhoff, T., Giebel, H.-A., and Simon, M. (2008). Diversity, ecology, and genomics of the roseobacter clade: a short overview. Arch Microbiol. *189* 531-539.

Broerse, A. T. C., Ziveri, P., and Honjo, S. (2000). Coccolithophore (-$CACO_3$) flux in the sea of okhotsk: seasonality, settling and alteration processes. Marine Micropaleontology, *39* 179-200.

Buchan, A., Gonzz, J. M., and Moran, M. A. (2005). Overview of themarine roseobacter lineage. Appl Environ Microbiol, *71* 5665-5677.

Bull, A. T., Stach, J. E. M.,Ward, A. C., and Goodfellow, M. (2005). Marine actinobacteria: perspectives, challenges, future directions. Antonie Van Leeuwenhoek, *87* 65-79.

Coenye, T. and Vandamme, P. (2003). Intragenomic heterogeneity between multiple 16S ribosomal RNA operons in sequenced bacterial genomes. FEMS Microbiology Letters, *228* 45-49.

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.

Cottrell, M. T. and Kirchman, D. L. (2000). Natural assemblages of marine proteobacteria and members of the cytophaga-flavobacter cluster consuming low- and high-molecular-weight dissolved organic matter. Appl Environ Microbiol, *66* 1692-1697.

Delegationen von 25 UN-Mitgliedsstaaten (2009). Decision -/cp.15. In Copenhagen accord.

Dhillon, A., Lever, M., Lloyd, K. G., Albert, D. B., Sogin, M. L., and Teske, A. (2005). Methanogen diversity evidenced by molecular characterization of methyl coenzyme m reductase a (mcra) genes in hydrothermal sediments of the guaymas basin. Applied and Environmental Microbiology, *71* 4592-4601.

DiTullio, G. R., Geesey, M. E., Maucher, J. M., Alm, M. B., Riseman, S. F., and Bruland, K. W. (2005). Influence of iron on algal community composition and physiological status in the peru upwelling system. Limnology and Oceanography, *50* 1887-1907.

Dobbin, P. S., Warren, L. H., Cook, N. J., McEwan, A. G., Powell, A. K., and Richardson, D. J. (1996). Dissimilatory iron(III) reduction by rhodobacter capsulatus. Microbiology-uk, *142* 765-774.

Duplessis, M. R., Dufour, S. C., Blankenship, L. E., Felbeck, H., and Yayanos, A. A. (2004). Anatomical and experimental evidence for particulate feeding in lucinoma aequizonata and parvilucina tenuisculpta (bivalvia : Lucinidae) from the santa barbara basin. Marine Biology, *145* 551-561.

Edmond, J. M. D., Measures, C., McDuff, R. E., Chan, L. H., Collier, R., Grant, B., Gordon, L. I., and Corliss, J. B. (1979). Ridge crest hydrothermal activity and the balances of the major and minor elements in the ocean - galapagos data. Earth and Planetary Science Letters, *46* 1-18.

Emerson, S. and Hedges, J. (2008). Chemical Oceanography and the Marine Carbon Cycle. Cambridge University Press.

Falkow, S. (2006). The Prokaryotes. Springer, 3 edition.

Ferry, J. G. (1999). Enzymology of one-carbon metabolism in methanogenic pathways. Fems Microbiology Reviews, *23* 13-38.

Franck, V. M., Smith, G. J., Bruland, K. W., and Brzezinski, M. A. (2005). Comparison of size-dependent carbon, nitrate, and silicic acid uptake rates in high- and lowiron waters. Limnology and Oceanography, *50* 825-838.

Friis, H. (1978). Heavy-mineral variability in miocene marine sediments in denmark: a combined effect of weathering and reworking. Sedimentary Geology, *21* 169-188.

Froelich, P., Klinkhammer, G., Bender, M., Luedtke, N., Heath, G., Cullen, D., Dauphin, P., Hammond, D., Hartman, B., and Maynard, V. (1979). Early oxidation of organic matter in pelagic sediments of the eastern equatorial atlantic: suboxic diagenesis. Geochimica et Cosmochimica Acta, *43* 1075-1090.

Fryer, J. L. and Hedrick, R. P. (2003). Piscirickettsia salmonis: a gramnegative intracellular bacterial pathogen of fish. J Fish Dis, *26* 251-262.

Ghosh, W. and Dam, B. (2009). Biochemistry and molecular biology of lithotrophic sulfur oxidation by taxonomically and ecologically diverse bacteria and archaea. FEMS Microbiology Reviews, *33* 999-1043.

Gorby, Y. A., Yanina, S., McLean, J. S., Rosso, K. M., Moyles, D., Dohnalkova, A., Beveridge, T. J., Chang, I. S., Kim, B. H., Kim, K. S., Culley, D. E., Reed, S. B., Romine, M. F., Saffarini, D. A., Hill, E. A., Shi, L., Elias, D. A., Kennedy, D. W., Pinchuk, G., Watanabe, K., Ishii, S., Logan, B., Nealson, K. H., and Fredrickson, J. K. (2009). Electrically conductive bacterial nanowires produced by shewanella oneidensis strain MR-1 and other microorganisms (vol 103, pg 11358, 2006). Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, *106* 9535-9535.

Goretzki, L. and Seidel, G. ans Steiner, W. (1987). Zur Verwitterung von Karbonatsteinen und Sandsteinen an Bauwerken. Hochschule f. Architektur und Bauwesen Weimar: Wissenschaftliche Zeitschrift, *33* 70-75.

Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. J Mol Biol, *166* 557-580.

Henne, A., Daniel, R., Schmitz, R. A., and Gottschalk, G. (1999). Construction of environmental DNA libraries in *Escherichia coli* and screening for the presence of genes conferring utilization of 4-hydroxybutyrate. Applied and Environmental Microbiology, *65* 3901-3907.

Hiebert, T. F. K. and Benett, P. C. (1992). Microbial control of silicate weathering in organic-rich ground-water. Science, *258* 278-281.

Hilley, G. E. and Porder, S. (2008). A framework for predicting global silicate weathering and CO_2 drawdown rates over geologic time-scales. Proceedings of the National Academy of Sciences, *105* 16855-16859.

Holmes, D. E., Bond, D. R., and Lovley, D. R. (2004). Electron transfer by desulfobulbus propionicus to Fe(III) and graphite electrodes. Applied and Environmental Microbiology, *70* 1234-1237.

Hongo, Y., Obata, H., Gamo, T., Nakaseama, M., Ishibashi, J., Konno, U., Saegusa, S., Ohkubo, S., and Tsunogai, U. (2007). Rare earth elements in the hydrothermal system at okinawa trough back-arc basin. Geochemical Journal, *41* 1-15.

Imhoff, J. F. (2001). True marine and halophilic anoxygenic phototrophic bacteria. Arch Microbiol, *176* 243-254.

Inagaki, F., Kuypers, M. M. M., Tsunogai, U., Ishibashi, J.-i., Nakamura, K.-i., Treude, T., Ohkubo, S., Nakaseama, M., Gena, K., Chiba, H., Hirayama, H., Nunoura, T., Takai, K., J-rgensen, B. B., Horikoshi, K., and Boetius, A. (2006). Microbial community in a sediment-hosted CO_2 lake of the southern okinawa trough hydrothermal system. Proceedings of the National Academy of Sciences, *103* 14164-14169.

Inagaki, F., Suzuki, M., Takai, K., Oida, H., Sakamoto, T., Aoki, K., Nealson, K. H., and Horikoshi, K. (2003). Microbial communities associated with geological horizons in coastal subseafloor sediments from the sea of okhotsk. Applied and Environmental Microbiology, *69* 7224-7235.

Ishii, K., Mussmann, M., MacGregor, B. J., and Amann, R. (2004). An improved fluorescence in situ hybridization protocol for the identification of bacteria and archaea in marine sediments. FEMS Microbiol Ecol, *50* 203-213.

Jansson, M. (1987). Anaerobic dissolution of iron phosphorus complexes in sediment due to the activity of nitrate-reducing bacteria. Microbial Ecology, *14* 81-89.

Jørgensen, B. B. (1982). Mineralization of organic-matter in the sea bed - the role of sulfate reduction. Nature, *296* 643-645.

Kasahara, R., Sato, T., Tamegai, H., and Kato, C. (2009). Piezo-adapted 3-isopropylmalate dehydrogenase of the obligate piezophile *Shewanella benthica* db21mt-2 isolated from the 11,000-m depth of the mariana trench. Bioscience Biotechnology and Biochemistry, *73* 2541-2543.

Kelly, D. and Wood, A. (2000a). Confirmation of thiobacillus denitrificans as a species of the genus thiobacillus, in the beta-subclass of the proteobacteria, with strain ncimb 9548 as the type strain. Int J Syst Evol Microbiol, *50* 547-550.

Kelly, D. and Wood, A. (2000b). Reclassification of some species of thiobacillus to the newly designated genera acidithiobacillus gen. nov., halothiobacillus gen. nov. and thermithiobacillus gen. nov. Int J Syst Evol Microbiol, *50* 511-516.

Kim, J., Dong, H. L., Seabaugh, J., Newell, S. W., and Eberl, D. D. (2004). Role of microbes in the smectite-to-illite reaction. Science, *303* 830-832.

Kleter, B., van Doorn, L. J., ter Schegget, J., Schrauwen, L., van Krimpen, K., Burger, M., ter Harmsel, B., and Quint, W. (1998). Novel short-fragment pcr assay for highly sensitive broad-spectrum detection of anogenital human papillomaviruses. American Journal of Pathology, *153* 731-1739.

Kniemeyer, O., Musat, F., Sievert, S. M., Knittel, K., Wilkes, H., Blumenberg, M., Michaelis, W., Classen, A., Bolm, C., Joye, S. B., and Widdel, F. (2007). Anaerobic oxidation of short-chain hydrocarbons by marine sulphate-reducing bacteria. Nature, *449* 898-901.

Konno, U., Tsunogai, U., Nakagawa, F., Nakaseama, M., Ishibashi, J.-I., Nunoura, T., and Nakamura, K.-I. (2006). Liquid CO_2 venting on the seafloor: Yonaguni knoll iv hydrothermal system, okinawa trough. Geophys. Res. Lett., *33* L16607-.

Kostka, J. E., Stucki, J. W., Nealson, K. H., and Wu, J. (1996). Reduction of structural Fe(III) in smectite by a pure culture of *Shewanella putrefaciens* strain MR-1. Clays and Clay Minerals, *44* 522-529.

Krumbein, W. E., Urzi, C. E., and Gehrmann, C. (1991). Biocorrosion and biodeterioration of antique and medieval glass. Geomicrobiology Journal, *9* 139-160.

Lauro, F., Bertoloni, G., Obraztsova, A., Kato, C., Tebo, B., and Bartlett, D. (2004). Pressure effects on clostridium strains isolated from a cold deep-sea environment. Extremophiles, *8* 169-173.

le Roux, W. J., Masoabi, D., de Wet, C. M. E., and Venter, S. N. (2004). Evaluation of a rapid polymerase chain reaction based identification technique for vibrio cholerae isolates. Water Science and Technology, *50* 229-232.

Leloup, J., Fossing, H., Kohls, K., Holmkvist, L., Borowski, C., and Jørgensen, B. B. (2009). Sulfate-reducing bacteria in marine sediment (aarhus bay, denmark): abundance and diversity related to geochemical zonation. Environ Microbiol, *11* 1278-1291.

Lipp, J. S., Morono, Y., Inagaki, F., and Hinrichs, K.-U. (2008). Significant contribution of archaea to extant biomass in marine subsurface sediments. Nature, *454* 991-994.

Lovley, D. R. and Phillips, E. J. P. (1988). Novel mode of microbial energy-metabolism - organic-carbon oxidation coupled to dissimilatory reduction of iron or manganese. Applied and Environmental Microbiology, *54* 1472-1480.

Lovley, D. R. (1993). Dissimilatory metal reduction. Annual Review of Microbiology, *47* 263-290.

Ludwig, W., Strunk, O., Westram, R., Richter, L., Meier, H., Yadhukumar, Buchner, A., Lai, T., Steppi, S., Jobb, G., Forster, W., Brettske, I., Gerber, S., Ginhart, A. W., Gross, O., Grumann, S., Hermann, S., Jost, R., Konig, A., Liss, T., Lussmann, R., May, M., Nonhoff, B., Reichel, B., Strehlow, R., Stamatakis, A., Stuckmann, N., Vilbig, A., Lenke, M., Ludwig, T., Bode, A., and Schleifer, K. H. (2004). Arb: a software environment for sequence data. Nucleic Acids Research, *32* 1363-1371.

McLeod, E. S., MacDonald, R., and Brozel, V. S. (2002). Distribution of *Shewanella putrefaciens* and desulfovibrio vulgaris in sulphidogenic biofilms of industrial cooling water systems determined by fluorescent in situ hybridisation. Water Sa, *28* 123-128.

Michaud, L., Giudice, A. L., Troussellier, M., Smedile, F., Bruni, V., and Blancheton, J. P. (2009). Phylogenetic characterization of the heterotrophic bacterial communities inhabiting a marine recirculating aquaculture system. J Appl Microbiol, *107* 1935-1946.

Mortatti, J. and Probst, J. L. (2003). Silicate rock weathering and atmospheric/soil CO_2 uptake in the amazon basin estimated from river water geochemistry: seasonal and spatial variations. Chemical Geology, *197* 177-196.

Myers, C. R. and Nealson, K. H. (1990). Respiration-linked proton translocation coupled to anaerobic reduction of manganese(IV) and iron(III) in *Shewanella putrefaciens* MR-1. J. Bacteriol., *172* 6232-6238.

Nakatsuka, T., Fujimune, T., Yoshikawa, C., Noriki, S., Kawamura, K., Fukamachi, Y., Mizuta, G., and Wakatsuchi, M. (2004). Biogenic and lithogenic particle fluxes in the western region of the sea of okhotsk: Implications for lateral material transport and biological productivity. Journal of Geophysical Research-oceans, *109* C09S13.

Nazarenko, E. L., Komandrova, N. A., Gorshkova, R. P., Tomshich, S. V., Zubkov, V. A., Kilcoyne, M., and Savage, A. V. (2003). Structures of polysaccharides and oligosaccharides of some

gram-negative marine proteobacteria. Carbohydr Res, *338* 2449-2457.

Nunoura, T., Oida, H., Nakaseama, M., Kosaka, A., Ohkubo, S. B., Kikuchi, T., Kazama, H., Hosoi-Tanabe, S., Nakamura, K.-I., Kinoshita, M., Hirayama, H., Inagaki, F., Tsunogai, U., Ishibashi, J.-I., and Takai, K. (2010). Archaeal diversity and distribution along thermal and geochemical gradients in hydrothermal sediments at the yonaguni knoll iv hydrothermal field in the southern okinawa trough. Appl. Environ. Microbiol., *76* 1198-1211.

Nurnberg, D. and Tiedemann, R. (2004). Environmental change in the sea of okhotsk during the last 1.1 million years. Paleoceanography, *19* PA4011.

Oki, T., Musiake, K., Matsuyama, H., and Masuda, K. (1995). Global atmospheric water balance and runoff from large river basins. Hydrological Processes, *9* 655-678.

Orcutt, B. N., Boetius, A., Lugo, S. K., MacDonald, I. R., Samarkin, V. A., and Joye, S. B. (2004). Life at the edge of methane ice: microbial cycling of carbon and sulfur in gulf of mexico gas hydrates. Chemical Geology, *205* 239-251.

Oremland, R. S. and Polcin, S. (1982). Methanogenesis and sulfate reduction: Competitive and noncompetitive substrates in estuarine sediments. Appl Environ Microbiol, *44* 1270-1276.

Orphan, V. J., Hinrichs, K. U., Ussler, W., Paull, C. K., Taylor, L. T., Sylva, S. P., Hayes, J. M., and Delong, E. F. (2001). Comparative analysis of methane-oxidizing archaea and sulfate-reducing bacteria in anoxic marine sediments. Appl Environ Microbiol, *67* 1922-1934.

O-Sullivan, L. A., Fuller, K. E., Thomas, E. M., Turley, C. M., Fry, J. C., and Weightman, A. J. (2004). Distribution and culturability of the uncultivated -agg58 cluster- of the bacteroidetes phylum in aquatic environments. FEMS Microbiol Ecol, *47* 359-370.

Pachauri, R. and (Eds.), A. R. (2007). Contribution of working groups i, ii and iii to the fourth assessment report of the intergovernmental panel on climate change. Technical report, Intergovernmental Panel of Climate Change.

Peiffer, S. and Gade, W. (2007). Reactivity of ferric oxides toward H_2S at low pH. Environmental Science Technology, *41* 3159-3164.

Pernthaler, A., Pernthaler, J., Schattenhofer, M., and Amann, R. (2002). Identification of DNA-synthesizing bacterial cells in coastal north sea plankton. Appl Environ Microbiol, *68* 5728-5736.

Pfannkuche, O., dos Santos Ferreira, C., Croot, P., Sommer, S., Camilli, R., Noffke, A., Domeyer, B., Hensen, C., Scholz, F., Dibbern, M., Glock, N., Ebbinghaus, R., Mosch, T., Bannert, B., Mallon, J., Hommer, J., Treude, T., Garco, M., Enriquez, E., Nernberg, D., Boeschen, T., Voigt, S., Bahr, A., Karas, C., and Truscheit, T. (2010). Meteor cruise report, cruise 77,leg 1. Technical report, IFM-GEOMAR.

Pina, R. G. and Cervantes, C. (1996). Microbial interactions with aluminium. BioMetals, *9* 311-316.

Piwosz, K. and Pernthaler, J. (2010). Seasonal population dynamics and trophic role of planktonic nanoflagellates in coastal surface waters of the southern baltic sea. Environmental Microbiology, *12* 364-377.

Pokrovsky, O. S., Shirokova, L. S., Benezeth, P., Schott, J., and Golubev, S. V. (2009). Effect of organic ligands and heterotrophic bacteria on wollastonite dissolution kinetics. American Journal of Science, *309* 731-772.

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

Reinhold-Hurek, B., Hurek, T., Claeyssens, M., and Vanmontagu, M. (1993). Cloning, expression in *Escherichia coli*, and characterization of cellulolytic enzymes of azoarcus sp, a root-invading diazotroph. Journal of Bacteriology, *175* 7056-7065.

Ribeiro, F. R., Fabris, J. D., Kostka, J. E., Komadel, P., and Stucki, J. W. (2009). Comparisons of structural iron reduction in smectites by bacteria and dithionite: II. a variable-temperature mossbauer spectroscopic study of garfield nontronite. Pure and Applied Chemistry, *81* 1499-1509.

Rochelle, P. A., Cragg, B. A., Fry, J. C., Parkes, R. J., andWeightman, A. J. (1994). Effect of sample handling on estimation of bacterial diversity in marine-sediments by 16S ribosomal-RNA gene sequence-analysis. Fems Microbiology Ecology, *15* 215-225.

Sekar, R., Pernthaler, A., Pernthaler, J., Warnecke, F., Posch, T., and Amann, R. (2003). An improved protocol for quantification of freshwater actinobacteria by fluorescence in situ hybridization. Appl Environ Microbiol, *69* 2928-2935.

Shao, M., Zhang, T., and Fang, H. H. P. (2009). Autotrophic denitrification and its effect on metal speciation during marine sediment remediation. Water Res, *43* 2961-2968.

Sibuet, J.-C., Letouzey, J., Barbier, F., Charvet, J., Foucher, J.-P., Hilde, T. W. C., Kimura, M., Ling-Yun, C., Marsset, B., Muller, C., and Stan, J.-F. (1987). Back arc extension in the okinawa trough. J. Geophys. Res., *92* 14041-14063.

Skovgaard, A. and Daugbjerg, N. (2008). Identity and systematic position of paradinium poucheti and other paradinium-like parasites of marine copepods based on morphology and nuclear-encoded ssu rdna. Protist, *159* 401-413.

Slightom, R. N. and Buchan, A. (2009). Surface colonization by marine roseobacters: integrating genotype and phenotype. Appl Environ Microbiol, *75* 6027-6037.

Sommer, S., Tuerk, M., Kriwanek, S., and Pfannkuche, O. (2008). Gas exchange system for extended in situ benthic chamber flux measurements under controlled oxygen conditions: First application - sea bed methane emission measurements at captain arutyunov mud volcano. Limnology and oceanography-methods, *6* 23-33.

Sorokin, D. Y. (2003). Oxidation of inorganic sulfur compounds by obligately organotrophic bacteria. Microbiology, *72* 641-653.

Sorokin, D. Y., Tourova, T. P., Bezsoudnova, E. Y., Pol, A., and Muyzer, G. (2007). Denitrification in a binary culture and thiocyanate metabolism in *Thiohalophilus thiocyanoxidans* gen. nov. sp. nov. - a moderately halophilic chemolithoautotrophic sulfuroxidizing gammaproteobacterium from hypersaline lakes. Arch Microbiol, *187* 41-450.

Staudigel, H., Furnes, H., McLoughlin, N., Banerjee, N. R., Connel, L. B., and Templeton, A. (2008). 3.5 billion years of glass bioalteration: Volcanic rocks as a basis for microbial life? Earth-science Reviews, *89* 156-176.

Staudigel, H. and Hart, S. R. (1983). Alteration of basaltic glass: Mechanisms and significance for the oceanic crust-seawater budget. Geochimica et Cosmochimica Acta, *47* 337-350.

Stillings, L. L., Drever, J. I., Brantley, S. L., Sun, Y., and Oxburgh, R. (1996). Rates of feldspar dissolution at ph 3-7 with 0-8 m m oxalic acid. Chemical Geology, *132* 79-89.

Stookey, L. L. (1970). Ferrozine-a new spectrophotometric reagent for iron. Analytical Chemistry,

42 779-781.

Stucki, J. W. and Kostka, J. E. (2006). Microbial reduction of iron in smectite. Comptes Rendus Geoscience, *338* 468-475.

Sundquist, E. T. (1993). The global carbon-dioxide budget (vol 259, pg 934, 1993). Science, *259* 1812-1812.

Suzuki, R., Ishibashi, J.-I., Nakaseama, M., Konno, U., Tsunogai, U., Gena, K., and Chiba, H. (2008). Diverse range of mineralization induced by phase separation of hydrothermal fluid: Case study of the yonaguni knoll iv hydrothermal field in the okinawa trough back-arc basin. Resource Geology, *58* 267-288.

Takai, K. and Horikoshi, K. (1999). Genetic diversity of archaea in deep-sea hydrothermal vent environments. Genetics, *152* 1285-1297.

Teske, A. and Sorensen, K. B. (2007). Uncultured archaea in deep marine subsurface sediments: have we caught them all? ISME J, *2* 3-18.

Treude, T., Smith, C. R., Wenzhofer, F., Carney, E., Bernardino, A. F., Hannides, A. K., Kruger, M., and Boetius, A. (2009). Biogeochemistry of a deep-sea whale fall: sulfate reduction, sulfide efflux and methanogenesis. Marine Ecology-progress Series, *382* 1-21.

Urey, H. C. (1962). Evidence regarding the origin of the earth: Presidential address, geochemical society meeting, nov. 3, 1961, Cincinnati, Ohio. Geochimica et Cosmochimica Acta, *26* 1-13.

Vandevivere, P., Welch, S. A., Ullman, W. J., and Kirchman, D. L. (1994). Enhanced dissolution of silicate minerals by bacteria at near-neutral pH. Microbial Ecology, *27* 241-251.

von Wintzingerode, F., Gobel, U. B., and Stackebrandt, E. (1997). Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of pcr-based rRNA analysis. Fems Microbiology Reviews, *21* 213-229.

Vorhies, J. S. and Gaines, R. R. (2009). Microbial dissolution of clay minerals as a source of iron and silica in marine sediments. Nature Geoscience, *2* 221-225.

Wagner-Doebler, I. and Biebl, H. (2006). Environmental biology of the marine roseobacter lineage. Annu Rev Microbiol, *60* 255-280.

Wallmann, K; Aloisi, G. H.-M. . T. P. E. A. (2004). Silicate weathering in sakhalin slope sediments. Technical report, IFM-GEOMAR Kiel; Laboratoire de Palnvironments et Paliosph Lyon; POI Wladiwostok.

Wallmann, K., Aloisi, G., Haeckel, M., Obzhirov, A., Pavlova, G., and Tishchenko, P. (2006). Kinetics of organic matter degradation, microbial methane generation, and gas hydrate formation in anoxic marine sediments. Geochimica Et Cosmochimica Acta, *70* 3905-3927.

Wallmann, K., Aloisi, G., Haeckel, M., Tishchenko, P., Pavlova, G., Greinert, J., Kutterolf, S., and Eisenhauer, A. (2008). Silicate weathering in anoxic marine sediments. Geochimica et Cosmochimica Acta, *72* 363-366.

Ward, A. C. and Bora, N. (2006). Diversity and biogeography of marine actinobacteria. Curr Opin Microbiol, *9* 279-286.

Webster, G., Parkes, R. J., Cragg, B. A., Newberry, C. J.,Weightman, A. J., and Fry, J. C. (2006). Prokaryotic community composition and biogeochemical processes in deep subseafloor sediments from the peru margin. Fems Microbiology Ecology, *58* 65-85.

Welch, S. A. and Ullman, W. J. (1993). The effect of organicacids on plagioclase dissolution rates and stoichiometry. Geochimica Et Cosmochimica Acta, *57* 2725-2736.

Welch, S. A. and Ullman, W. J. (1999). The effect of microbial glucose metabolism on bytownite feldspar dissolution rates between 5 and 35°C. Geochimica et Cosmochimica Acta, *63* 3247-3259.

Winslow, A. (1884). Peculiarities of weathering in the pottsville conglomerate. Science, *3* 12-14.

Yanagawa, K. (2010). Phylogenetic community structures based on 16S crDNA clone libraries of domains bacteria from muc8 core, during so196. Katsunori Yanagawa Department of Earth and Planetary Science, University of Tokyo, Japan by personal communication.

Yokoyama, T., Taguchi, S., Motomura, Y., Watanabe, K., Nakanishi, T., Aramaki, Y., and Izawa, E. (2004). The effect of aluminum on the biodeposition of silica in hot spring water: Chemical state of aluminum in siliceous deposits collected along the hot spring water stream of steep cone hot spring in yellowstone national park, usa. Chemical Geology, *212* 329-337.

Zhou, Y., Zhang, Y.-Q., Zhi, X.-Y., Wang, X., Dong, J., Chen, Y., Lai, R., and Li, W.-J. (2008). Description of *Sinobacter flavus* gen. nov., sp. nov., and proposal of sinobacteraceae fam. nov. Int J Syst Evol Microbiol, *58* 184-189.

11 Danksagung

Mein erster Dank geht an Prof. Dr. T. Treude und Prof. R. Schmitz-Streit für die Bereitstellung des Themas und die Integration in ihre Arbeitsgruppen.
Beiden Arbeitsgruppen gilt mein Dank für die freundliche Aufnahme, fachliche Förderung und kompetente Hilfe bei Fragen und Problemen, die Umweltproben dann und wann aufwerfen...

Für technische Unterstützung und Methoden außerhalb der beiden Arbeitsgruppen möchte ich mich bei: Ana, Regina, Markus, Niko, Beth, Bettina, Annette, Anke, Chrisitian, Carina und Katrin bedanken.

Im Speziellen Danke ich:
Dr. C. Deusner der glücklicherweise nicht müde wurde Werte und Worte zu diskutieren und die HPLC-Analysen ermöglichte

Dr. K. Knittel für ihre große Hilfe bei der 16S rDNA-Analyse

den Mitarbeitern des IPÖs, besonders Annette, für die Bereitstellung von Geräten und eine nette wissenschaftliche Nachbarschaft

Dr. C. Desel für ihre Hilfe am CLSM

K. Yanagawa für Hilfe bei der phylogenetischen Analyse des Okinawa Trogs

Dr. M. Haeckel, der neben fachlicher Beratung es mir auch ermöglichte meine Diplomarbeit mit "Haeckel" zu machen, was seit meiner Zeit an der FSU Jena eine gewisse historische Herausforderung war

Dr. O. Pfannkuche und Christine Utrecht für einen Vorabeinblick in noch nicht veröffentlichte Fahrtreporte

S. Krause für die Glovebox 1.0 und Stunden vor dem REM

Hannah und Doro für eine Diplomandengruppe mit unspezifischer Schokolase- und Kaffeease-Aktivität, für Daten- und Protokolldiskussion und für einen freundschaftlichen Zusammenhalt

Prof. Dr. A. Scheidig für seine fachliche und sehr faire Beratung

LaTeX

Meinen Freunden für ihre perfekte moralische Unterstützung: HUA!

Meiner Familie, der ich diese Arbeit als Dank für all das widme, was sie auf dem Weg bis hierher tapfer ertragen und stets unterstützt hat - Habt vielen lieben Dank für offenbar unendliches Vertrauen!
Sven nicht nur für die Gestaltung des Covers
Linda, ohne Dich wäre das Alles und noch viel mehr nicht möglich gewesen... (∞ + 5)

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt die vorliegende Arbeit mit dem Titel:
„Vergleichende biogeochemische und genetische Analysen zur mikrobiellen Silikatverwitterung in marinen Sedimenten “
selbstständig und unter ausschließlicher Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel erstellt zu haben.

Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder noch nicht veröffentlichten Quellen entnommen sind, sind als solche kenntlich gemacht.

Die Arbeit wurde bisher in gleicher oder ähnlicher Form keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt und auch nicht veröffentlicht.

Kiel, den 30. März 2010 Lars Bremer

IFM-GEOMAR

Leibniz-Institut für Meereswissenschaften
an der Universität Kiel

C A U

Christian-Albrechts-Universität zu Kiel