

Isolierung und Charakterisierung neuartiger acidophiler Archaea

Zur Erlangung des akademischen Grades eines

DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN

(Dr. rer. nat.)

der KIT-Fakultät für Chemie und Biowissenschaften

des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT)

genehmigte

DISSERTATION

von

Susanne Krause

aus

Magdeburg

KIT-Dekan: Prof. Dr. Willem Klopper

Referent: Prof. Dr. Johannes Gescher

Korreferent: Prof. Dr. Reinhard Fischer

Tag der mündlichen Prüfung: 26.07.2017



Dieses Werk ist lizenziert unter einer Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz (CC BY 4.0): <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.de>

Erklärung an Eides statt

Hiermit versichere ich, dass ich die folgende Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet habe. Alle wörtlich oder dem Sinn nach aus anderen Texten entnommenen Stellen sind von mir durch Angabe der Quelle gekennzeichnet. Weiterhin habe ich beim Anfertigen dieser Arbeit die Regeln zur Sicherung der guten wissenschaftlichen Praxis des KIT beachtet und alle Primärdaten gemäß Abs. A (6) am Institut archiviert. Des Weiteren versichere ich, dass die elektronische mit der schriftlichen Form dieser Arbeit übereinstimmt.

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden von Juli 2013 bis Juni 2017 am Institut für Angewandte Biowissenschaften der Fakultät für Chemie und Biowissenschaften des Karlsruher Instituts für Technologie unter der Leitung von Professor Johannes Gescher durchgeführt.

Karlsruhe, den 19.06.2017

Susanne Krause

Publikationsliste

Susanne Krause, Andreas Bremges, Philipp Münch, Alice McHardy and Johannes Gescher. Characterisation of a stable laboratory co-culture of acidophilic nanoorganisms. *Sci Rep*, 2017; 7: 3289.

Sibylle Ziegler, Kerstin Dolch, Katharina Geiger, Susanne Krause, Maximilian Asskamp, Karin Eusterhues, Michael Kriews, Dorothee Wilhelms-Dick, Jörg Göttlicher, Juraj Majzlan and Johannes Gescher. Oxygen-dependent niche formation of a pyrite-dependent acidophilic consortium built by archaea and bacteria. *ISME J*, 2013; 7: 1725–1737.

Vorträge und Konferenzbeiträge

Vortrag auf der Jahrestagung der *Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie* (VAAM) in Würzburg/Deutschland, März 2017.

Laboratory cultivation of acidophilic nanoorganisms. Physiological and bioinformatic dissection of a stable laboratory co-culture.

Poster Präsentation auf der Jahrestagung der *Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie* (VAAM) in Jena/Deutschland, März 2016.

Insights into the life of nanoorganisms.

Eingeladener Vortrag am Tag der offenen Tür am KIT in Karlsruhe/Deutschland, Juni 2015.
Katzengold und Schwefelsäure.

Poster Präsentation auf der Jahrestagung der *Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie* (VAAM) in Marburg (Lahn)/Deutschland, März 2015.

From acidic stalactites to nanoorganisms.

Poster Präsentation auf der Jahrestagung der *Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie* (VAAM) in Dresden/Deutschland, Oktober 2014.

Lighting up the dark matter of snottite biofilms.

Ausgezeichnet mit dem Posterpreis Microbiology and Infection 2014.

Poster Präsentation auf dem 15. *International Symposium on Microbial Ecology* in Seoul/Südkorea, August 2014.

Ecological insight in a microbial stalactite-like biofilm.

Poster Präsentation auf der *Biofilms 6* Konferenz in Wien, Österreich, Mai 2014.

About the life in an acidic snottite.

Zusammenfassung

Bergbaugebiete haben oftmals mit dem zu schweren Umweltbelastungen führenden Phänomen der sauren Grubenwässer (acid mine drainage, AMD) zu kämpfen. AMD wird hauptsächlich durch Mikroorganismen verursacht, indem diese den Prozess durch Oxidation von Eisen- und Schwefelverbindungen um das bis zu 1×10^6 -fache beschleunigen. Dies ermöglicht ihnen, sich ihre eigene ökologische Nische zu formen.

Bisher wurde hauptsächlich die Rolle der Bacteria, welche die Primärproduzenten dieser Konsortien darstellen, innerhalb solcher mikrobiologischen Gemeinschaften untersucht.

Aber auch Archaea scheinen in diesen Konsortien eine große Rolle zu spielen und dominieren oftmals die mikrooxischen und anoxischen Abschnitte der Biofilme. Bis heute wurden vermehrt unkultivierte Vertreter der Archaea entdeckt, wobei auch ihre genaue Rolle innerhalb der Konsortien noch nicht vollständig geklärt ist.

In dieser Arbeit wurde eine Ko-Kultur acidophiler Archaea aus dem ehemaligen Pyritbergwerk „Drei Kronen und Ehrt“ erfolgreich angereichert, charakterisiert und einzelne Organismen isoliert. Analysen einer 454-Sequenzierung bestätigten zunächst die erfolgreiche Elimination der im Ursprungsbiofilm vorkommenden Bacteria und die Anreicherung einer Ko-Kultur bestehend aus acidophilen Archaea und einem Pilz. Metagenomanalysen der Ko-Kulturen verifizierten das Vorkommen zweier Mitglieder der *Thermoplasmatales*, wobei einer einen neuen Stamm von *Cuniculiplasma divulgatum* darstellt und der andere der erste Vertreter einer neuen Gattung innerhalb der *Thermoplasmatales* ist. Des Weiteren bestanden die Ko-Kulturen aus einem ARMAN-verwandten Organismus und dem acidophilen Pilz *Acidothrix acidophila*. ARMAN (Archaeal Richmond Mine Acidophilic Nanoorganisms) sind ultrakleine, bisher unkultivierte Archaea. Bis auf *N. equitans* und *N. acidilobi*, welche beide als parasitisch lebend beschrieben sind, sind bis dato noch keine ultrakleinen Archaea kultiviert. Aus den Metagenomdaten ging hervor, dass der ARMAN-verwandte Organismus weitgehend unfähig ist Zucker zu metabolisieren, da keine Schlüsselenzyme für den Zuckeranabolismus oder -katabolismus gefunden werden konnten. Mikroskopische Analysen zeigten, dass ARMAN-verwandte Organismen grundsätzlich in Zellaggregaten der *Thermoplasmatales* zu finden waren. Dies könnte die Versorgung der ARMAN-verwandten Organismen mit Zuckern über den Abbau der extrapolymeren Matrix anderer Mitglieder der Ko-Kulturen gewährleisten.

Auch Beobachtungen aus Wachstumsversuchen legten nahe, dass die ARMAN nicht parasitisch, sondern eher kommensalistisch leben. Des Weiteren ist es gelungen *Acidothrix acidophila* und die neue Gattung der *Thermoplasmatales* zu isolieren und *Cuniculiplasma divulgatum* aus den Anreicherungskulturen zu eliminieren. Erste Wachstumsversuche deuten darüber hinaus an, dass der Pilz einen temperatursensitiven Wachstumsfaktor für den *Thermoplasmatales*-zugehörigen Organismus bereitstellt. Versuche mit einer neuen Kultivierungsplattform indizieren die Elimination des Pilzes aus einer Ko-Kultur bestehend aus dem Organismus der neuen Gattung innerhalb der *Thermoplasmatales* und des ARMAN-verwandten Organismus.

Inhaltsverzeichnis

Publikationsliste	I
Zusammenfassung.....	II
Inhaltsverzeichnis.....	IV
Abkürzungsverzeichnis.....	VII
1 Einleitung	- 1 -
1.1 Pyritmine „Drei Kronen und Ehrh“	- 1 -
1.2 <i>Thermoplasmatales</i>	- 6 -
1.3 Nanoorganismen	- 12 -
1.4 ARMAN.....	- 15 -
1.5 Herausforderungen bei der Kultivierung unkultivierbarer Mikroorganismen	- 17 -
1.6 Zielsetzung.....	- 19 -
2 Material.....	- 20 -
2.1 Kulturen und Bakterienstämme	- 20 -
2.2 Kultivierungsplattformen	- 20 -
2.2.1 Fertigung der mikrofluidischen Fließzellen	- 21 -
2.2.2 Versuchsaufbau	- 21 -
2.3 Plasmide.....	- 23 -
2.4 Primer	- 23 -
2.5 HRP-Sonden	- 25 -
2.6 Tyramid-Konjugate	- 25 -
2.7 Chemikalien, Enzyme und Kits	- 26 -
3 Methoden	- 27 -
3.1 Kultivierungsmethoden.....	- 27 -
3.1.1 Medium für die Archaeenanreicherung	- 27 -
3.1.2 Anaerobes Arbeiten	- 29 -
3.1.3 Medium für die Kultivierung acidophiler Pilze	- 30 -
3.1.4 Isolierungsstrategien.....	- 31 -
3.1.5 Kultivierung von <i>E. coli</i> für die Klonierung.....	- 33 -
3.1.6 Kultivierungsbedingungen in der Fließzelle.....	- 33 -
3.1.7 Kryokonservierung.....	- 34 -
3.2 Molekularbiologische Methoden.....	- 34 -
3.2.1 DNA Isolation.....	- 34 -
3.2.2 DNA-/RNA-Isolation für die Metgenomik/Metatranskriptomik	- 34 -
3.2.3 Aufreinigung von PCR Produkten	- 35 -

3.2.4	Quantifizierung der DNA	- 35 -
3.2.5	Isolation von Plasmiden	- 35 -
3.2.6	PCR (Polymerasekettenreaktion).....	- 35 -
3.2.7	Fusion von PCR-Fragmenten	- 37 -
3.2.8	Quantifizierung der Zellzahl mittels qPCR.....	- 38 -
3.2.9	Agarose-Gelelektrophorese.....	- 40 -
3.2.10	CARD-FISH (Catalyzed reporter deposition fluorescence <i>in situ</i> hybridisation)	- 41 -
3.2.11	CARD-FISH der Fließzellen.....	- 44 -
3.2.12	Klonierung	- 46 -
3.2.13	Transformation in kompetente Zellen	- 48 -
3.2.14	CRIM-Klonierung	- 48 -
3.3	Sequenzierungsmethoden	- 49 -
3.3.1	DNA-Sequenzierung, Alignments und Stammbäume	- 49 -
3.3.2	454 Sequenzierung	- 49 -
3.3.3	Illumina Sequenzierung.....	- 50 -
3.4	Bioinformatische Analysen	- 51 -
3.4.1	Phylogenetische Analyse der Ko-Kulturen.....	- 51 -
3.4.2	Analyse des Metagenoms und Metatranskriptoms.....	- 52 -
3.5	Fluoreszenzmikroskopie	- 54 -
3.6	Konfokalmikroskopie	- 55 -
3.7	Bestimmung der Fe ²⁺ -Konzentration mittels Ferrozine-Test	- 56 -
4	Ergebnisse	- 57 -
4.1	454 Sequenzierung.....	- 57 -
4.2	Metagenom	- 59 -
4.3	Metatranskriptom.....	- 71 -
4.4	Timeline der Anreicherungskulturen mit A_DKE, B_DKE und C_DKE	- 73 -
4.5	Anreicherungskulturen mit A_DKE und B_DKE.....	- 76 -
4.5.1	Temperatur-Timeline mit A_DKE und B_DKE	- 76 -
4.5.2	Einfluss des Pilzes auf das Wachstum von A_DKE und B_DKE	- 79 -
4.6	Isolierungsstrategien.....	- 81 -
4.6.1	Isolation von <i>Acidothrix acidophila</i>	- 82 -
4.6.2	Isolation von B_DKE	- 82 -
4.7	Ausblick - Alternative Kultivierungstechniken.....	- 83 -
5	Diskussion	- 86 -
5.1	Analyse der Zusammensetzung der Ko-Kulturen.....	- 88 -
5.2	Analyse des Metagenoms	- 90 -
5.3	Analyse des ARMAN/A_DKE Stoffwechsels.....	- 92 -

5.4	Vergleich B_DKE und C_DKE mit anderen <i>Thermoplasmatales</i>	- 93 -
5.5	Analyse des Metatranskriptoms.....	- 95 -
5.6	Wachstumsversuche mit A_DKE, B_DKE und C_DKE.....	- 96 -
5.7	Wachstumsversuche mit A_DKE und B_DKE.....	- 97 -
5.8	Isolierungsversuche.....	- 99 -
6	Ausblick	- 101 -
	Anhang	- 112 -
	Danksagung	- 170 -

Abkürzungsverzeichnis

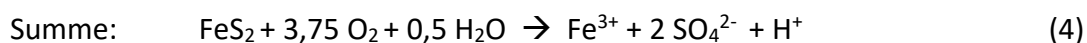
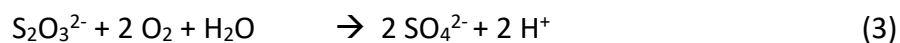
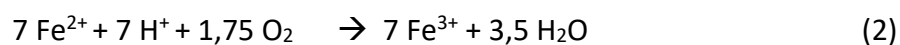
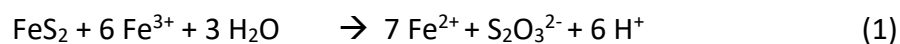
A_DKE	ARMAN-verwandter Organismus aus DK&E
AMD	Acid Mine Drainage
ARMAN	Archaeal Richmond Mine Acidophilic Nanoorganisms
B_DKE	Vertreter einer neuen Ordnung der <i>Thermoplasmatales</i> aus DK&E
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
bp	Basenpaare
CARD-FISH	catalyzed reporter deposition fluorescence <i>in situ</i> hybridization
C_DKE	<i>Cuniculiplasma sp.</i> aus DK&E
DAPI	4',6-Diamidin-2-Phenylindol
DK&E	Bergwerk „Drei Kronen und Ehr“
ED	Entner-Doudoroff-Weg
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
dH ₂ O	destilliertes Wasser
FA	Formaldehyd
Ferrozine	Dinatrium-4,4'-(3-(pyridin-2-yl)-1,2,4-triazin-5,6-diyl)bis(benzolsulfonat)
KEGG	<i>Kyoto Encyclopedia for Genes and Genomes</i>
NCBI	<i>National Center for Biotechnological Information</i>
ORF	open reading frame
OTU	operational taxonomic unit
RPKM	reads per kilobase per million mapped reads
sp.	Spezies
TCA	Citratzyklus

1 Einleitung

1.1 Pyritmine „Drei Kronen und Ehrh“

Ehemalige Pyritminen stellen ideale Lebensräume für säureliebende Mikroorganismen dar. Durch die Offenlegung sulfidischer Erze während der Abbauarbeiten gelangt Sauerstoff an die sonst abgeschlossenen Gesteinsschichten, welche infolgedessen oxidieren und Sulfat-Salze bilden. Das Eindringen von Grund- und Regenwasser löst diese Salze und das Wasser wird angesäuert. Saure Grubenwässer, auch AMD (engl. Acid Mine Drainage) genannt, entstehen (McGinness, 1999).

Pyrit ist das häufigste sulfidische Mineral der Erde. Unter sauren Bedingungen ist die Oxidation von Pyrit zwar ebenfalls sauerstoffabhängig, die eigentliche Oxidation aber findet bis zu 100-mal schneller durch Fe^{3+} -Ionen, als durch Sauerstoff statt (Singer und Stumm, 1970).



Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt in dieser Gleichung ist die Oxidation von Fe^{2+} zu Fe^{3+} (2) (Singer und Stumm, 1970), welcher unter sauren Umständen abiotisch extrem langsam vonstattengeht. Mikroorganismen können Fe^{2+} jedoch als Elektronendonator verwenden, welcher aufgrund dessen zu Fe^{3+} oxidiert wird und somit wiederum für die Oxidation von Pyrit zur Verfügung steht. Infolge hoher Stoffwechselaktivität der Mikroorganismen kann Schritt (2) der Gleichung bis auf den Faktor 10^6 beschleunigt werden (Singer und Stumm, 1970). Somit schaffen sich diese säureliebenden Mikroorganismen ihre eigene ökologische Nische und formen ihre Umwelt weiträumig.

Noch sind längst nicht alle Prozesse bekannt, welche zur Ansäuerung der Minen führen. So leben bisher erforschte Mikroorganismen in enger Beziehung zu noch unbekanntem Vertretern, sowohl der Bacteria als auch der Archaea, aber auch Eukaryoten sind in diesen komplexen Netzwerken zu finden (Baker *et al.*, 2009; Amaral Zettler *et al.*, 2002).

Da die Ansäuerung der Minenwässer ein großes ökologisches Problem darstellt, ist es wichtig die zu Grunde liegenden Prozesse zu verstehen. So säuern die Minenwässer nicht nur umliegende Seen und Flüsse an. Durch die Absenkung des pH-Wertes gehen unter neutralen Umweltbedingungen unlösliche Schwermetalle in Lösung (Chuan *et al.*, 1996) und vergiften die Böden um die Minen weiträumig.

Eine dieser Minen ist die ehemalige Pyritmine *Drei Kronen und Ehart* in Elbingerode, Harz. Nach knapp 1000 Jahren des Bergbaus wurde die Mine nach der Wende 1990 stillgelegt und zum Besucherbergwerk umgebaut. Zur Vermeidung von AMD wurde die Mine zu großen Teilen mit Spülversatz aus Industrieasche und Kalksteinsiebrückständen befüllt (Scheffler, 2002). Trotz dieser Maßnahmen waren in der Mine saure Grubenwässer mit einem pH-Wert von bis zu 2,5 zu finden. An Decken und Wänden der Stollen wuchsen Biofilme, welche mit schwefelsaurem Wasser durchflossen wurden.



Abb. 1-1: Stalaktit-ähnliche, acidophile Biofilme aus dem ehemaligen Pyritbergwerk "Drei Kronen und Ehart".

Speziell die von der Decke hängenden Stalaktit-ähnlichen, gelartigen Biofilme wurden von Sibylle Ziegler im Rahmen ihrer Doktorarbeit charakterisiert (Abb. 1-1).

Die Biofilme haben einen pH-Wert von 2,2-2,6, während in der wässrigen Matrix 200 mM Sulfat und 60 mM Eisen zu finden waren (Ziegler *et al.*, 2009). Während Jarosit das am häufigsten vertretene Mineral war, wurden Arabinose, Rhamnose, Galactose und Mannose als hauptsächliche Zuckerkomponenten der extrapolymeren Matrix beschrieben.

Messungen der CO₂-Fixierung über den Querschnitt der Biofilme machte deutlich, dass diese nur in den Randbereichen stattfand. XANES-Messungen (X-ray absorption near edge spectroscopy) ergaben Jarosit (KFe₃³⁺(SO₄)(OH)₆) und Fe(II)SO₄ als dominante Eisenspezies im Biofilm. Schwefelhaltige Spezies waren vor allem Thiol, ein Sulfoxid, Sulfonsäuregruppen und in den Randbereichen Sulfat, welches meist mit oxidierten Eisenverbindungen kolokalisiert war. Hingegen war die Sulfonsäure ausschließlich im Inneren der Biofilme nachzuweisen (Ziegler *et al.*, 2013).

Messungen der Sauerstoffkonzentrationen quer durch die Biofilme machten deutlich, dass diese im Inneren anoxisch waren. So nimmt die Sauerstoffkonzentration von außen nach innen rapide ab, wodurch schon nach 700 µm die anoxische Zone beginnt (Abb. 1-2). Da sich die Biofilme nach unten hin verjüngen, sind die Spitzen durchgehend oxisch. Die rasche Abnahme der Sauerstoffkonzentration deutet auf eine hohe Oxidationsrate innerhalb der Biofilme hin.

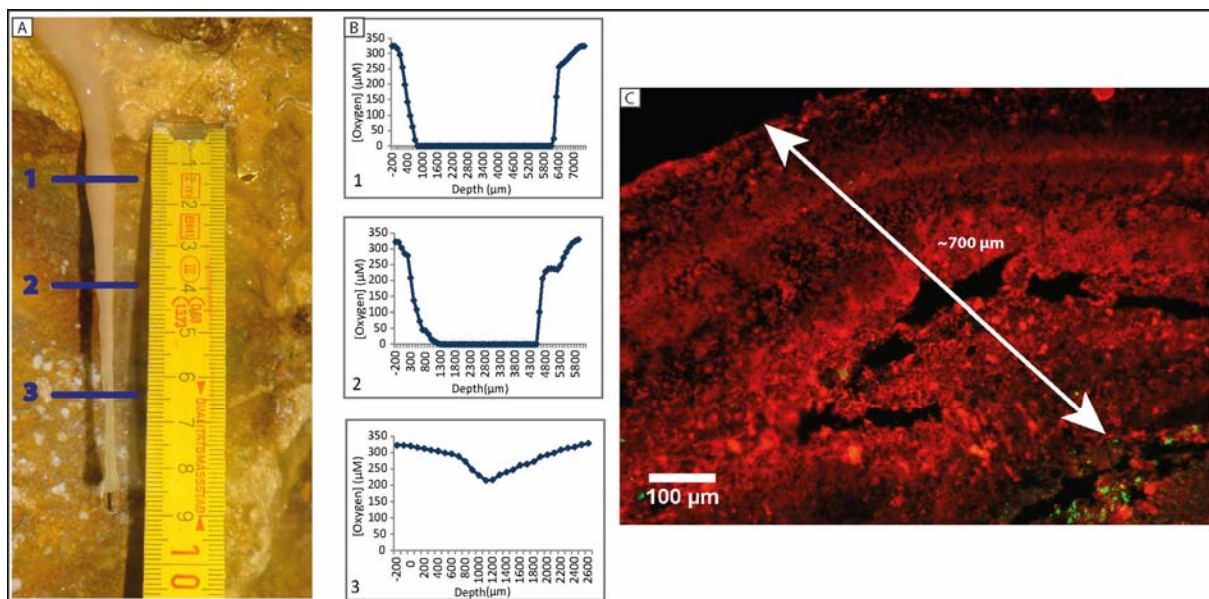


Abb. 1-2: Sauerstoffprofil eines Biofilms und CARD-FISH Bild eines Querschnitts. (A & B) Das Sauerstoffprofil, welches am nächsten zur Firste gemessen wurde (B1), zeigt die schnellste Abnahme des Sauerstoffgehalts. Nach 700 µm konnte kein Sauerstoff mehr nachgewiesen werden. (B2) Hier konnte nach 1300 µm kein Sauerstoff mehr nachgewiesen. (B3) Keine anoxische Zone erkennbar. (C) CARD-FISH Bild eines Biofilmquerschnitts. Bacteria in rot (EUB388, Alexa546) und Archaea in grün (ARCH915, Alexa488). (Nach Ziegler *et al.*, 2013).

Eine Analyse des mikrobiellen Konsortiums über eine 454 Pyrosequenzierung zeigte *Leptospirillum* als dominante Gattung innerhalb des Biofilms (Ziegler *et al.*, 2013). Diese acidophilen Bakterien sind als strikt aerob wachsend beschrieben und können Fe²⁺ mit Sauerstoff als Elektronenakzeptor zu Fe³⁺ oxidieren. Damit übereinstimmend wurden

Leptospirillum-Arten ausschließlich in den aeroben Randbereichen der Biofilme gefunden. Auch die zweithäufigsten Vertreter *Acidithiobacillus* sp. sind eisenoxidierende Bakterien, welche aber über den gesamten Biofilm verteilt detektiert werden konnten. Sie leben strikt autotroph und sind in der Lage unter anaeroben Bedingungen Schwefel mit Fe(III) als Elektronenakzeptor zu oxidieren. Aber auch Archaea, zugehörig zur Ordnung der *Thermoplasmatales* und nicht näher klassifizierbare Euryarchaeota konnten im Biofilm gefunden werden. CARD-FISH Analysen der Biofilme zeigten, dass nur im inneren anoxischen Kern der Biofilme Archaea zu finden waren (Abb. 1-2). Eine phylogenetische Einordnung der im Biofilm gefundenen Archaea machte deutlich, dass die Mehrheit nächstverwandt zu unkultivierten Vertretern der *Thermoplasmatales* sind.

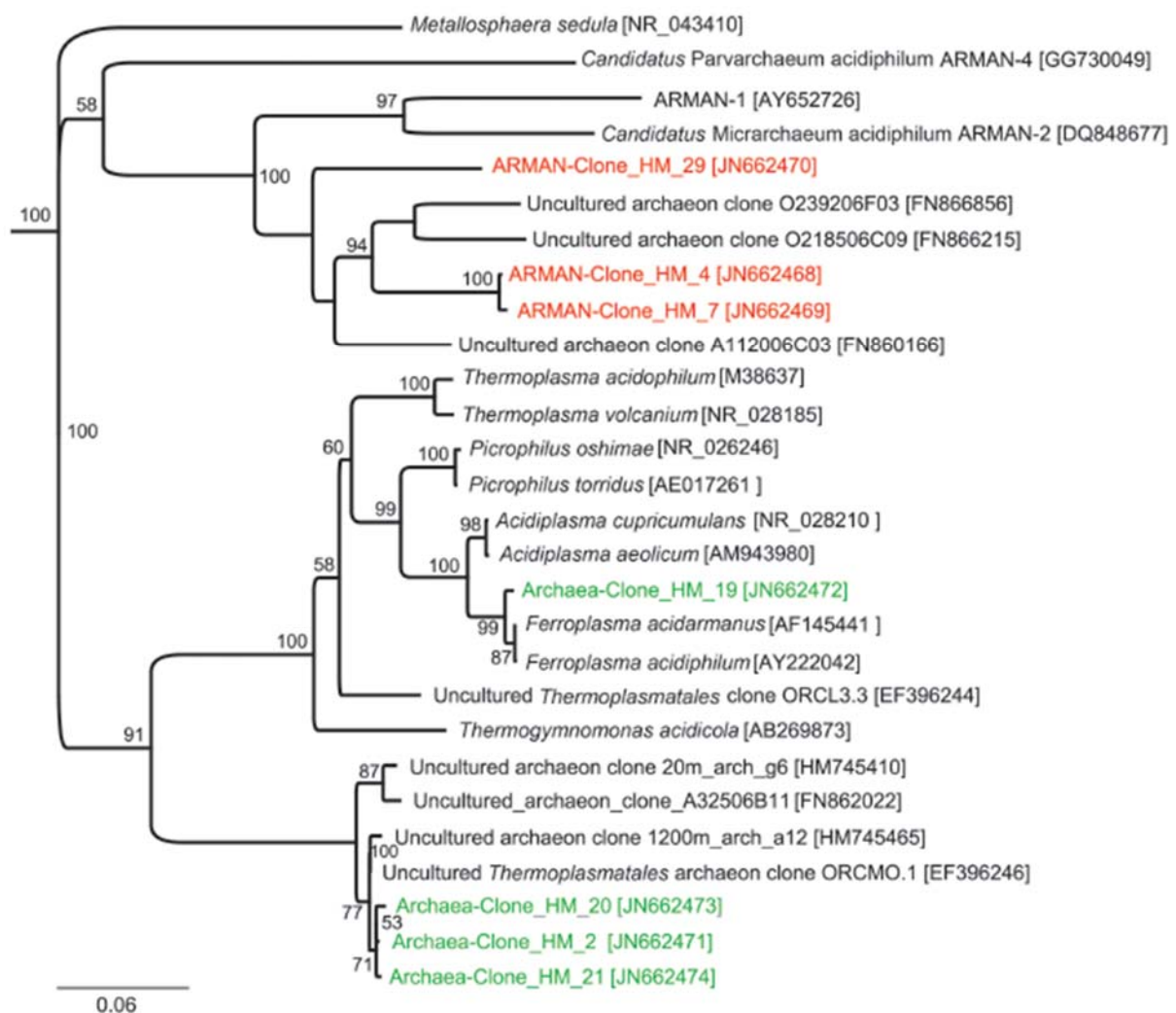


Abb. 1-3: 16S rRNA basierter phylogenetischer Stammbaum von gefundenen Archaea und verwandten Sequenzen. Die neighbor-joining Methode wurde genutzt und Bootstrap Werte wurden aus 1000 Replika berechnet. Bootstrap-Werte >50 sind im Graph angezeigt. (Aus Ziegler *et al.*, 2013).

Bis auf Archaea-Clone_HM_19, welcher *Ferroplasma* sp. als nächstverwandte Art hat, wurden zu den anderen drei Klonen nur unkultivierte Vertreter gefunden. Außerdem wurden Arten gefunden, welche nächstverwandt zu denen von Baker *et al.* (2006) entdeckten ARMAN (Archaeal Richmond Mine Acidophilic Nanoorganisms) sind. Auch diese wurden ausschließlich in den anoxischen Bereichen der Biofilme gefunden.

Welche Rolle die Archaea innerhalb der acidophilen Konsortien AMD-gezeichneter Gebiete innehaben ist noch nicht bewiesen. So wurde bisher davon ausgegangen, dass Bacteria den größten Einfluss auf AMD haben. Sie stellen die Primärproduzenten dieser Konsortien, welche chemolithoautotroph meist Eisen- und Schwefelverbindungen mithilfe von Sauerstoff oxidieren, oft unter Auflösung von Pyrit (Johnson, 1998; Baker und Banfield, 2003). Jedoch scheint der Anteil an Archaea in manchen Konsortien extrem hoch zu sein. So fanden Edwards *et al.* (2000) in den Iron Mountains in Kalifornien Konsortien, welche bis zu 85 % *Ferroplasma* sp. beinhalteten. Darüber hinaus konnte von Justice *et al.* (2012) gezeigt werden, dass zwar aerobe Biofilme in den Iron Mountains von Bakterien dominiert werden, unter Wasser liegende Biofilme aber, welche microaerob oder anaerob sind, hauptsächlich Archaea beinhalteten. Des Weiteren ist bekannt, dass einige *Thermoplasmatales* unter anaeroben Bedingungen chemoorganotroph leben, wobei sie in der Lage sind, Fe^{3+} als Elektronenakzeptor zu nutzen und dabei zu reduzieren (siehe Kapitel 1.2). Daher wurde postuliert, dass die acidophilen Archaea eine große Rolle beim Abbau der Biofilme und im anaeroben Nährstoffkreislauf spielen. Auch Ziegler *et al.* (2013) postulieren einen heterotrophen Metabolismus der Archaea, welche organische Substanzen der Bacteria für ihren Energie- und Kohlenstoffmetabolismus nutzen könnten.

Trotz der Existenz einiger Studien, welche die Zusammensetzung der mikrobiologischen Konsortien untersuchten, wird aus diesen doch klar, dass noch viel Forschungsarbeit getätigt werden muss, um alle Zusammenhänge innerhalb dieser Biozönosen zu verstehen. Allein die Anzahl molekularbiologisch nachgewiesener Archaea-Arten, welche noch keinen isolierten Verwandten besitzen macht dies deutlich.

1.2 *Thermoplasmatales*

Die in den Biofilmen der Pyritmine Drei Kronen und Ehrhart detektierten Archaea gehörten hauptsächlich zur Ordnung der *Thermoplasmatales*. Phylogenetisch zählen sie zur Abteilung der Euryarchaeota (Woese *et al.*, 1990). Bisher sind vier Familien (*Thermoplasmaceae*, *Ferropasmaceae*, *Picrophilaceae*, und *Cuniculiplasmaceae*) und die Gattung *Thermogymnomonas*, welche bisher als *incertae sedis* eingestuft ist, bekannt. Allen bisher gefundenen *Thermoplasmatales* ist ihre Acidophilie und das Fehlen einer Zellwand gemein, wodurch sie pleomorph sind.

Thermoplasmaceae

Zur Familie der *Thermoplasmaceae* gehört die Gattung *Thermoplasma*, welche bisher aus zwei Arten, *T. acidophilum* und *T. volcanium*, besteht. *T. acidophilum* wurde aus einer selbsterhitzenden Kohlehalde isoliert (Darland *et al.*, 1970), wobei auch spätere Funde in Kombination mit der Isolation von *T. volcanium* in Solfataren gemacht wurden (Seegerer *et al.*, 1988). Beide Arten sind pleomorph, motil und besitzen eine Flagelle. Sie sind mit 0,2-5 µm relativ klein. Optimale Wachstumsbedingungen wurden zwischen pH-Werten von 1-2 und einer Temperatur von um die 60 °C festgestellt. Beide sind fakultativ anaerob, obligat heterotroph und benötigen Hefeextrakt zum Wachsen, welcher aber durch Fleisch- oder Bakterienextrakt ersetzt werden kann. Anaerob wachsen *Thermoplasma* spp. mit elementarem Schwefel, den sie zu H₂S reduzieren (Seegerer *et al.*, 1988). Die Analyse des Genoms von *T. acidophilum* zeigte ein 1,56 Mbp großes Genom (Ruepp *et al.*, 2000). Darin wurden proteincodierende Gene für einen vollständigen Citratzyklus gefunden. Ein Zuckerabbau über die Glykolyse scheint aber wegen des Fehlens der Enzyme Phosphofruktokinase und Fructose-1,6-bisphosphat-Aldolase nicht abzulaufen. *T. acidophilum* scheint hingegen Zucker über die nicht-phosphorylierte Variante des Entner Doudoroff Weges abzubauen (Budgen and Danson, 1986).

Ferroplasmaceae

Die Familie der *Ferroplasmaceae* besteht aus den Gattungen *Ferroplasma* und *Acidiplasma*. *Ferroplasma* wiederum beinhaltet bisher drei isolierte Arten (*F. acidiphilum*, *F. thermophilum* und *F. acidarmanus*), mit einigen isolierten Stämmen. Sie wurden aus einem Bioreaktor einer Pilotanlage zur Laugung von goldhaltigen Pyriterzen (Russland) (Golyshina *et al.*, 2000), einem Kupferkies verarbeitenden Bioreaktor (China) (Zhou *et al.*, 2008) und einem Streamer auf der Oberfläche von Sulfiderzkörpern (USA) (Edwards *et al.*, 2000) isoliert. Stämme und 16S rRNA Gensequenzen von *Ferroplasma* spp. wurden bisher weltweit unter sauren Umweltbedingungen in Erzlagerstätten, von AMD betroffenen Gebieten und Gebieten mit geothermaler Aktivität gefunden (Golyshina, 2011). Die pH-Optima der unterschiedlichen Arten liegen zwischen 1,0 und 1,7, wobei *F. acidarmanus* mit einem tolerierten pH-Wert von 0 am säuretolerantesten ist. Die optimale Wachstumstemperatur liegt zwischen 35 °C und 45 °C, was allen Arten eine moderate Thermophilie zuspricht. *F. thermophilum* kann mit 60 °C die höchsten Temperaturen tolerieren. Mit einem Durchmesser von 0,3 µm–3 µm sind sie etwas kleiner als *Thermoplasma* spp.. Alle bisher beschriebenen *Ferroplasma* sp. wachsen chemoorganotroph bzw. chemomixotroph und koppeln die Oxidation von Fe(II) an die Reduktion von Hefeextrakt. Als fakultativ anaerobe Organismen können sie zusätzlich unter anoxischen Bedingungen Fe(III) reduzieren. Für *F. acidarmanus* sind neben Hefeextrakt noch Casaminsäuren und unterschiedliche Zucker als adäquate Kohlenstoffquellen beschrieben (Dopson *et al.*, 2004). Ursprünglich wurde *F. acidiphilum* als strikt aerober, autotropher Organismus beschrieben (Golyshina *et al.*, 2000). Spätere Arbeiten zweifeln autotrophes Wachstum jedoch an und stufen *F. acidiphilum* als chemoorganotroph ein (Dopson *et al.*, 2004; Dopson *et al.*, 2005). Auch eine genomische Evidenz für die CO₂-Fixierung fehlt bisher. So konnten lediglich einige Enzyme für eine Kohlenstoffixierung über den reduktiven Coenzym A Weg in *F. acidarmanus* und *Ferroplasma* spp. gefunden werden, ein vollständiger Zyklus ließ sich aber nicht rekonstruieren (Tyson *et al.*, 2004). Zugleich verweist dieselbe Studie auf eine hohe Anzahl codierter Zucker- und Aminosäuretransporter, was eher einen heterotrophen Metabolismus indiziert.

Zur Gattung *Acidiplasma* gehören bisher zwei Arten, *A. aeolicum* und *A. cupricumulans*. Letzterer wurde ursprünglich als *Ferroplasma cupricumulans* isoliert (Hawkes *et al.*, 2006), später aber von Golyshina *et al.* (2009) in die Gattung der *Acidiplasma* eingestuft.

A. aeolicum hat ein Temperaturoptimum zwischen 42 °C und 45 °C und sein optimaler pH-Wert liegt bei 1,4-1,6. Diese Art wurde aus einem hydrothermalen Becken auf der Insel Vulcano (Italien) isoliert. Die Organismen sind fakultativ anaerob und wachsen unter oxidischen Bedingungen chemomixotroph mit Hefeextrakt und oxidieren Fe^{2+} und reduzierte Schwefelverbindungen oder chemoorganotroph mit Hefeextrakt und wahlweise Glucose. Unter anoxischen Bedingungen können sie Fe(III)SO_4 als Elektronenakzeptor nutzen. *A. cupricumulans* hat mit 55 °C ein vergleichsweise leicht höheres Temperaturoptimum, wobei der optimale pH-Wert mit 1,0 -1,2 etwas niedriger liegt. Die Isolierung erfolgte aus einer Chalkosin-Halde eines mikrobiell Erz-laugenden Prozesses (Myanmar). Die Art wächst wie alle *Ferroplasmaceae* chemomixotroph mit Hefeextrakt und Fe^{2+} und kann unter anaeroben Bedingungen Fe^{3+} reduzieren.

Picrophilaceae

Die Familie der *Picrophilaceae* besteht derzeit aus zwei Arten, *Picrophilus oshimae* und *Picrophilus torridus*, welche beide aus Solfataren-geprägten Regionen im Norden Japans isoliert wurden (Schleper *et al.*, 1995). Die Zellen haben einen Durchmesser von 1 μm –1,5 μm und im Gegensatz zu allen bisher bekannten *Thermoplasmatales* besitzen *Picrophilaceae* einen S-layer auf der Cytoplasma-Membran. Der intrazelluläre pH-Wert ist mit 4,6 relativ niedrig und auch die Membran zeigt mit ihrer sehr niedrigen Protonenpermeabilität eine Anpassung an den extrem niedrigen pH-Wert ihres Lebensraumes (Van de Vossenberg *et al.*, 1998). Mit einem optimalen pH-Wert von 0,7 und einem minimal tolerierten pH-Wert von -0,06 sind *Picrophilaceae* die extremsten bisher bekannten acidophilen Organismen. Ihre optimale Wachstumstemperatur liegt bei 60 °C. Im Gegensatz zu anderen *Thermoplasmatales* sind *Picrophilaceae* als obligat aerob beschrieben, wobei sie Hefeextrakt verstoffwechseln. Ebenso sind sie auch in der Lage Glucose, Sucrose und Lactose abzubauen, obgleich ein Zusatz von Hefeextrakt zwingend notwendig ist (Schleper *et al.*, 1995). Darüber hinaus wurden Enzyme zum Abbau von Mannose, Maltose und Stärke gefunden (Angelov *et al.*, 2006; Schepers *et al.*, 2006). Mit 1,55 Mbp hat *P. torridus* das kleinste Genom aerober, heterotropher Mikroorganismen und die höchste Gendichte aller thermoacidophilen Mikroorganismen (Fütterer *et al.*, 2004). Eine Analyse des Genoms zeigte einen Abbau von Glucose/Galactose (Angelov *et al.*, 2005) über den

nicht-phosphorylierten Entner-Doudoroff Weg, einen kompletten Citratzyklus und eine fast vollständige Gluconeogenese (Fütterer *et al.*, 2004). Des Weiteren wurde eine große Anzahl an Genen gefunden, welche für Transporter codieren, was als weitere Anpassung an die hohe Protonenkonzentration in der Umgebung der Zellen gedeutet wird.

Cuniculiplasmaceae

Cuniculiplasma divulgatum stellt mit bisher zwei isolierten Stämmen den einzigen Vertreter der Familie der *Cuniculiplasmaceae* dar. Die Stämme wurden aus sauren Streamern auf kupfererzhaltigen sulfidischen Lagerstätten in Nord Wales und Süd-West Spanien isoliert (Golyshina *et al.*, 2016a). Die Zellen sind mit 0,1 µm–2 µm Durchmesser relativ klein und wie alle *Thermoplasmatales* pleomorph. Optimale Wachstumsbedingungen wurden bei einem pH-Wert von 1,0-1,2 und einer Temperatur von 37 °C bis 40 °C festgestellt. Aber auch bei sehr niedrigen Temperaturen bis zu 10 °C konnte noch Wachstum festgestellt werden, was die *Cuniculiplasmaceae* als psychrotolerant von den anderen *Thermoplasmatales* unterscheidet. Beide Stämme wachsen fakultativ anaerob und obligat heterotroph auf Hefe- oder Fleischextrakt und mit Eisencitrat, Schwefel oder Kaliumnitrat als Elektronenakzeptoren unter anaeroben Bedingungen. Sie haben mit bis zu 1,94 Mbp das bisher größte Genom innerhalb der *Thermoplasmatales* (Golyshina *et al.*, 2016b). Der Citratzyklus konnte nicht vollständig aus den genomischen Daten rekonstruiert werden, wobei die 2-Oxoglutarat-Dehydrogenase und die Fumarat-Reduktase fehlten. Wie auch schon bei anderen *Thermoplasmatales* konnten nicht alle Enzyme für die Glykolyse, dafür aber für die Gluconeogenese gefunden werden. Der Zuckerabbau scheint auch in *Cuniculiplasma* spp. über den nicht-phosphorylierten Entner-Doudoroff Weg abzulaufen. Darüber hinaus wird der nicht-phosphorylierte Pentosephosphatweg in beiden Stämmen codiert.

***Thermogymnomonas* sp.**

Die Gattung *Thermogymnomonas* ist bisher als *incertae sedis* innerhalb der *Thermoplasmatales* eingestuft und umfasst zur Zeit mit *Thermogymnomonas acidicola* eine Art, welche aus einem solfatarischen Gebiet in Japan isoliert wurde (Itoh *et al.*, 2007). Die Zellen sind 0,8 µm–8 µm groß und zeigen leichte Autofluoreszenz bei 420 nm.

Optimale Wachstumsbedingungen wurden bei einem pH-Wert von 3,0 und einer Temperatur von 60 °C festgestellt. Wie die *Picrophilaceae* ist auch *Thermogymnomonas* als obligat aerob beschrieben und benötigt Hefeextrakt zum Wachsen.

Unkultivierte Vertreter der *Thermoplasmatales*

Abgesehen von den bisher isolierten Vertretern der *Thermoplasmatales* existieren viele Berichte über 16S rDNA Sequenzen, welche nächstverwandt zu den *Thermoplasmatales* sind, bisher aber nur in Umweltproben gefunden wurden. Dies erstreckt sich über die Erweiterung der bisher bekannten Familien hinaus und indiziert die Präsenz neuer Familien innerhalb der *Thermoplasmatales*. Ein Beispiel sind die sogenannten „Alphabet Plasmas“ (Baker und Banfield, 2003). Sequenzen der „Alphabet Plasmas“ wurden bisher in unterschiedlichen Regionen gefunden, so zum Beispiel in den Iron Mountains (USA) (Justice *et al.*, 2012), in sauren Minenwässern einer Pyritmine in China (Tan *et al.*, 2009) oder dem sulfidreichen Höhlensystem Frasassi (Italien) (Macalady *et al.*, 2007). Die Charakterisierung von Biofilmen unterhalb der Wasseroberfläche saurer Minenwässer in den Iron Mountains zeigt, dass diese von Archaeen dominiert werden, wobei unter anderem auch „Alphabet Plasma“-Sequenzen gefunden wurden (Justice *et al.*, 2012). Die Rekonstruktion der Genome von A-, E-, G- und IPlasma weisen auf potentiell ausgebildete S-Layer aller untersuchten „Alphabet Plasmas“ hin (Yelton *et al.*, 2013). Außerdem deuten die Ergebnisse auf eine fakultativ anaerobe Lebensweise hin, wobei codierende Bereiche für den Abbau von Zuckern über den nicht-phosphorylierten Entner-Doudoroff Weg gefunden wurden, ebenso wie für die Glykolyse, den Citratzyklus und eine aerobe Elektronentransportkette. Des Weiteren wurden Hinweise auf den Abbau von einfachen Kohlenstoffverbindungen wie Methanol gefunden. Während A-, B-, C-, D-, E- und GPlasma innerhalb der *Thermoplasmatales* clustern, scheint IPlasma nicht zu den Thermoplasmata zu gehören und stattdessen eine neue Klasse innerhalb der Euryarchaeota zu vertreten (Abb. 1-4).

GPlasma wurde 2016 von Golyshina *et al.* als *Cuniculiplasma divulgatum* isoliert.

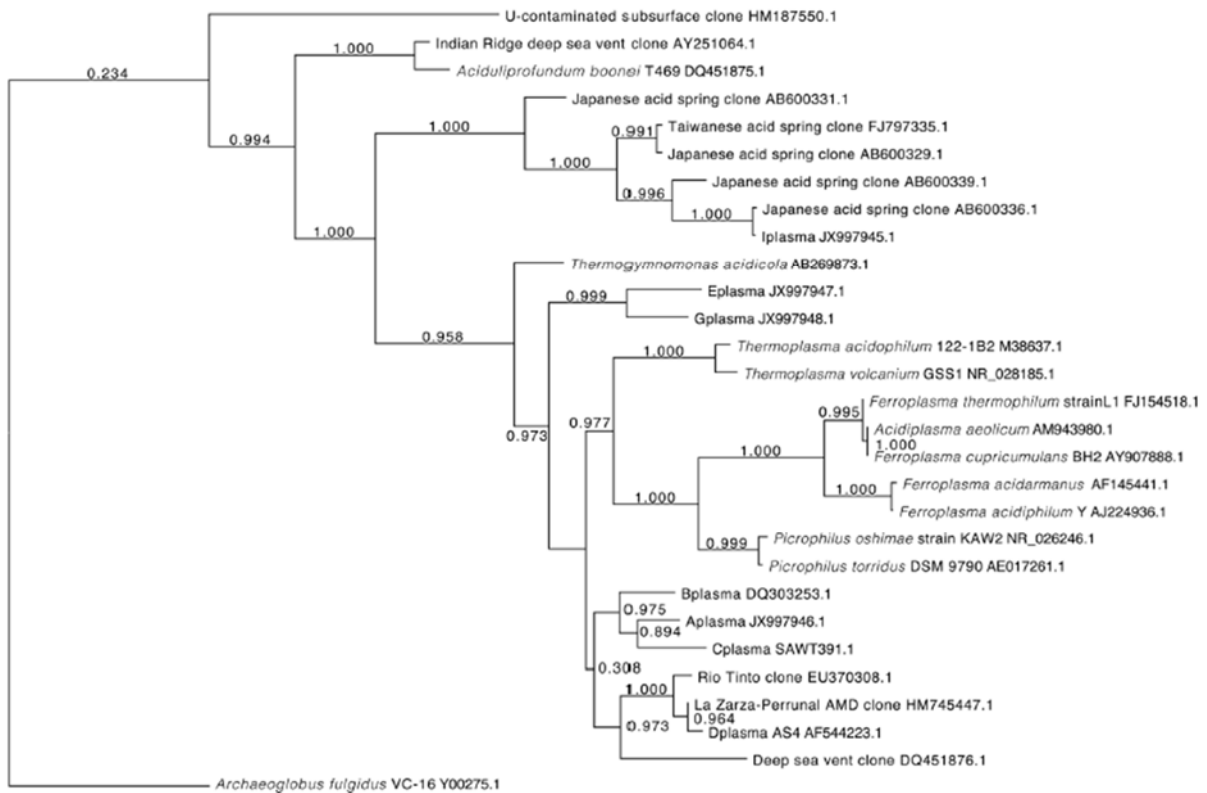


Abb. 1-4: 16S rDNA Stammbaum, welcher die phylogenetische Sonderstellung von *Iplasma* darstellt. (Aus Yelton *et al.*, 2013).

Methanogenese in AMD-Gebieten?

Eine andere bisher weitgehend unkultivierte und unerforschte Gruppe ist die der sogenannten „Methanoplasmatales“ (Paul *et al.*, 2012), zu denen auch der aus menschlichem Stuhl isolierte *Methanomassiliicoccus luminyensis* gezählt wird (Dridi *et al.*, 2012). Sein nächster isolierter Verwandter ist „*Candidatus Acidolipifundum boonei*“ (Reysenbach *et al.*, 2006). Mit nur 83 % Übereinstimmung der 16S rDNA Sequenzen ist dieser phylogenetisch recht weit entfernt von den *Thermoplasmatales*, gehört aber zu den „rumen cluster C“ (RCC, früher auch rice cluster C *Thermoplasmata*), einer Gruppe unkultivierter methylothropher methanogener Organismen, welche zu den *Thermoplasmata* gezählt werden (Poulsen *et al.*, 2013). Aber auch die phänotypische Charakterisierung von *M. luminyensis* lässt auf weiter entfernte Verwandtschaft schließen. So ist er als obligat anaerob und mesophil einzustufen, mit einem optimalen pH-Wert von 7,6 und 37 °C optimaler Wachstumstemperatur. Des Weiteren produziert er Methan über die Reduktion von Methanol (Dridi *et al.*, 2012). Trotz der entfernten Verwandtschaft und der Mesophilie von *M. luminyensis* bleibt die Frage, ob methanogene Organismen in solch sauren Gebieten, wie sie in AMD dominierten Gegenden zu finden sind, existieren können. Der bisher

säuretoleranteste methanogene Organismus ist *Methanoregula boonei*, welcher aus einem sauren Torfmoor isoliert wurde (Bräuer *et al.*, 2006). Obwohl *M. boonei* pH-Werte von bis zu 4,5 überlebt, liegt sein Optimum bei einem pH-Wert von 5,1 und ist damit eher als säuretolerant bzw. moderat acidophil einzustufen (Bräuer *et al.*, 2011). Obwohl bisher ausschließlich mesophile Methanogene bekannt sind, wurde in Anreicherungskulturen aus dem Rio Tinto (Spanien), welcher einen mittleren pH-Wert von 2,2 aufweist, Methanproduktion detektiert und infolge dessen methanogene Organismen identifiziert (Sanz *et al.*, 2011). Die Methanproduktion war stets an eine Verschiebung des pH-Wertes von ~3,3 nach ~6,6 gekoppelt. Trotzdem weisen diese Ergebnisse darauf hin, dass methanogene Organismen in Mikronischen mit erhöhten pH-Werten in AMD-gezeichneten Gebieten überleben können.

1.3 Nanoorganismen

Welche Größe muss eine Zelle mindestens haben, um autonom leben zu können? Diese Frage wurde in der Vergangenheit intensiv und kontrovers in Mikrobiologiekreisen aber auch in der Medizin diskutiert. Die Lenkungsreis des Workshops on Size Limits of very small Microorganisms definierte 1999 die theoretische Untergrenze für eine autonom lebensfähige Zelle, welche alle notwendigen Zellbestandteile enthält, auf 0,008-0,014 μm^3 . Schon 1972 gab es erste Berichte über „Zwergen-Zellen“, mit weniger als 0,3 μm im Durchmesser, aus elektronenmikroskopischen Aufnahmen von Bodenproben, welche bis zu 72 % aller gesichteten Zellen ausmachen sollten (Bae *et al.*, 1972). Weitere Berichte über „Nannobacteria“ in Erdproben (Folk, 1993) oder „Ultramicrobacteria“ in Meerwasser (Torrella and Morita, 1981), zusammen mit aufkommenden Berichten über die vermeintliche medizinische Relevanz dieser Organismen (Folk, 1993), waren der Ausgangspunkt für eine neue Forschungsrichtung. Kritische Studien stellten jedoch die Existenz von Nanobakterien und deren medizinische Rolle in Frage und definierten „Nanobacteria“ als sich selbst ausbreitenden mikrokristallinen Apatit (Torrella and Morita, 1981), präzipitierendes CaCO_3 (Martel and Young, 2008) oder allgemein Komplexe aus Mineralen und Fettsäuren (Raoult *et al.*, 2008). Andere Studien zeigen, dass kristalline Aggregate zellähnliche Strukturen annehmen können und daher nicht allein anhand morphologischer Merkmale auf die Existenz lebender Organismen geschlossen werden kann (Garcia-Ruiz *et al.*, 2009).

Aber auch mikrobielle Überdauerungsformen, müssen als potentielle Kandidaten in Betracht gezogen werden (Kjelleberg, 1993).

Unabhängig davon wurden in den vergangenen Jahren immer mehr Organismen mit einer Größe nahe oder unter dem theoretischen Limit in unterschiedlichen Habitaten gefunden. In Übereinstimmung mit den frühen Funden der „Zwergen-Zellen“, wurden nach der Filtration von Wasserproben durch 0,2 μm und 0,1 μm Filter und anschließender Sequenzierung der 16S rRNA Gene sogenannte „ultra-small organisms“ gefunden, welche zwar weitverbreitet zu sein scheinen, jedoch keinen kultivierten Verwandten besitzen (Miyoshi *et al.*, 2005; Luef *et al.*, 2015; Brailsford *et al.*, 2017). Luef *et al.* (2015) stellten sogar die Hypothese auf, dass ein generelles Charakteristikum solch unkultivierter Stämme ihre geringe Größe sei. Bisher isolierte Ultramikrobakteria gehören zu unterschiedlichen Stämmen wie den Actinobacteria (Hahn *et al.*, 2003), den Bacteroidetes (Suzina *et al.*, 2011) oder den Alphaproteobakterien (Duda *et al.*, 2007; Rappé *et al.*, 2002). Sie haben Zellvolumina von $<0,1 \mu\text{m}^3$ bis $<0,004 \mu\text{m}^3$ und ihr Energiemetabolismus ist als chemoorganotroph, heterotroph oder fakultativ parasitisch beschrieben. Jedoch fehlen in vielen Fällen bisher genauere Informationen über beispielsweise Wachstumsbedingungen, die ökologische Rolle der isolierten Organismen oder genomische und transkriptomische Daten.

Innerhalb der Archaea sind bisher deutlich weniger ultrakleine Arten bekannt. So stellen *Nanoarchaeum equitans* und der kürzlich kultivierte „*Nanopusillus acidilobi*“ die einzigen bisher unter Laborbedingungen kultivierten und charakterisierten Vertreter dar. Aus heißen Felsen und Kies in Island konnte mit einer anaeroben Inkubation von 90 °C ein Vertreter der neuen Archaeen-Gattung *Ignicoccus* isoliert werden. Mit ihm, unter gleichen Bedingungen inkubiert, wurde sein Symbiont *Nanoarchaeum equitans* kultiviert (Abb. 1-5), welcher einen neuen Stamm innerhalb der Archaea darstellt und eine Zellgröße von nur 400 nm im Durchmesser besitzt (Huber *et al.*, 2002). Das Genom von *N. equitans* ist mit 490 kbp sehr klein. Allerdings fehlen *N. equitans* fast alle Gene für die primäre Biosynthese, aber auch für den Zentral- und Energiemetabolismus (Waters *et al.*, 2003). Dies weist auf eine strenge Abhängigkeit von *N. equitans* von seinem Wirt *I. hospitalis* hin. Unterstützt wird diese Annahme durch die Beobachtung, dass sich *I. hospitalis* Zellen, welche mit mehr als zwei *N. equitans* Zellen infiziert sind, nicht mehr teilen, wobei die Generationszeit und finale Zelldichte nicht durch eine Infektion beeinflusst werden (Jahn *et al.*, 2008). Da weder eine sichtbare Schädigung der Zellen, noch Änderungen der genomischen Regulationen des Wirts

festzustellen sind, wurde *N. equitans* als nahrungsabhängiger Parasit definiert (Giannone *et al.*, 2015).

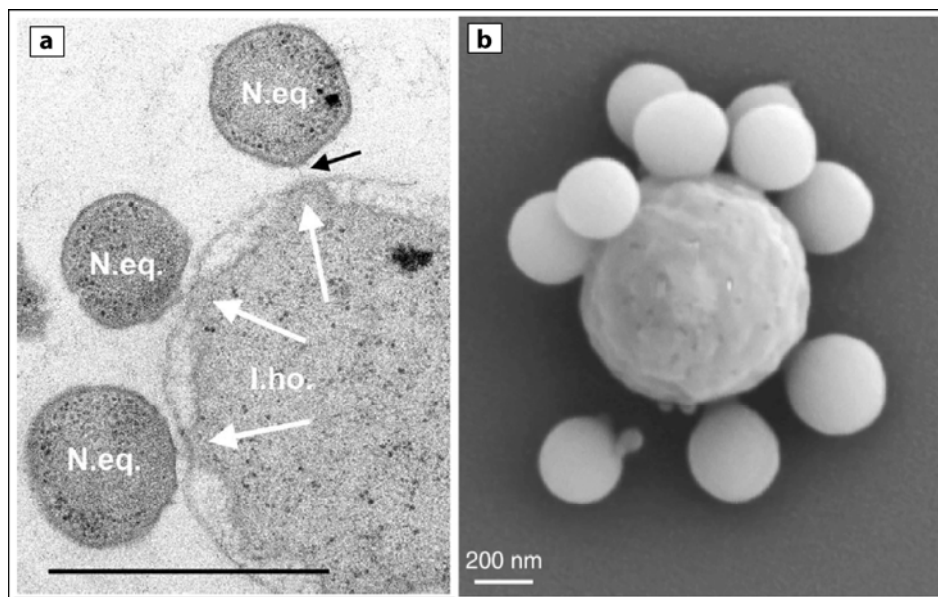


Abb. 1-5: (a) Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme von Ultradünnschnitten von *I. hospitalis* und *N. equitans*. Maßstabsbalken 1 µm. (Aus Jahn *et al.*, 2008). (b) Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von *I. hospitalis* und *N. equitans* Ko-Kulturen (Aus Giannone *et al.*, 2015).

Ähnlich wie *N. equitans* wird *Nanopusillus acidilobi* als obligater Ektosymbiont oder Parasit beschrieben (Wurch *et al.*, 2016). Er wurde zusammen mit seinem Wirt *Acidilobus sp.* aus einer heißen, sauren Quelle im Yellowstone Nationalpark (USA) kultiviert. Die Zellen von *N. acidilobi* haben einen Durchmesser von 100-300 nm (Abb. 1-6) und zeigen optimales Wachstum zusammen mit dem Wirt bei 82 °C und einem pH-Wert von 3,6. Das Genom ist mit 605 kbp etwas größer als das von *N. equitans*. Bis auf wenige proteincodierende Gene, welche in die Gluconeogenese involviert sein könnten, fehlt auch *N. acidilobi* die Mehrheit der genetischen Information für den Energiemetabolismus und primäre Biosynthesewege.

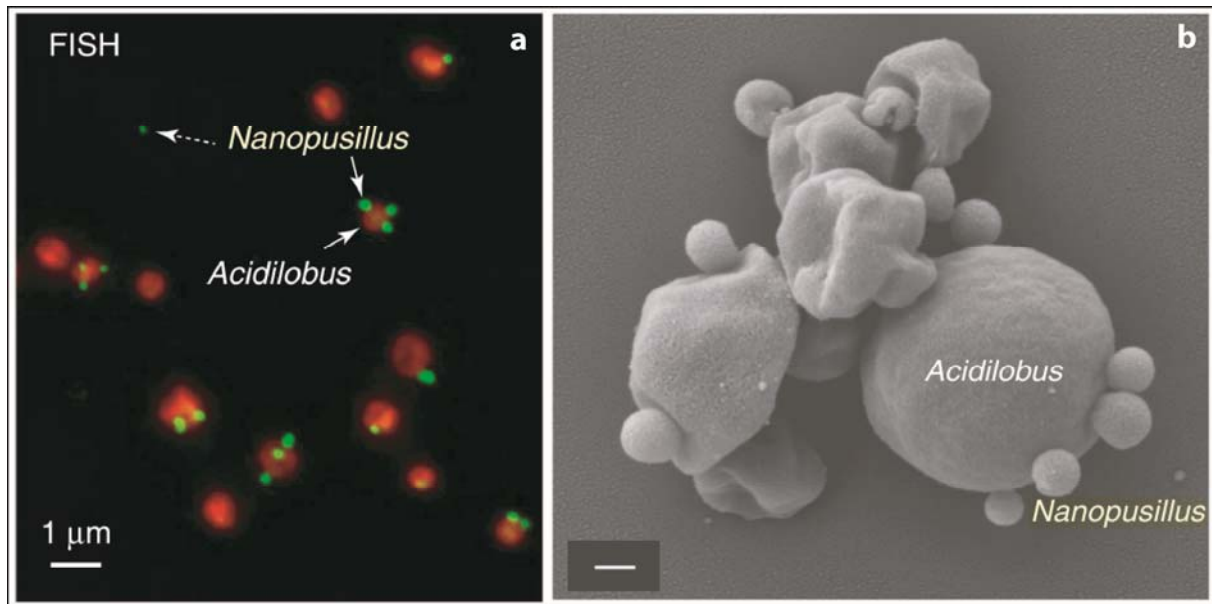


Abb. 1-6: (a) FISH Bild einer *N. acidilobi* und *Acidilobus* sp. Ko-Kultur. Nanoarchaeota-Sonde (grün), Crenarchaea-Sonde (orange). (b) Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme einer Ko-Kultur. Maßstabsbalken 200 nm. (Aus Wurch *et al.*, 2016).

1.4 ARMAN

ARMAN (Archaal Richmond Mine Acidophilic Nanoorganisms) sind sehr kleine Vertreter der Archaea, welche im Jahr 2006 von Baker *et al.* aus genomischen Analysen von acidophilen Biofilmen der Richmond Mine in den Iron Mountains in Kalifornien entdeckt wurden. In ihrem natürlichen Habitat wurden Temperaturen von 30 °C bis 59 °C gemessen und pH-Werte von 0,5 bis 1,5. Sie zählen zu den Euryarchaeota. Bisher sind fünf unterschiedliche ARMAN-Gruppen bekannt (ARMAN-1 bis ARMAN-5), wobei für ARMAN-2 der Name „*Candidatus* Micrarchaeum acidiphilum“ und für ARMAN-4 bzw. -5 die Namen „*Candidatus* Parvarchaeum acidiphilum“ und „*Candidatus* Parvarchaeum acidophilus“ vorgeschlagen wurden (Baker *et al.*, 2006; Baker *et al.*, 2010). Aus 3D-kryoelektronentomographischen Bildern wurde die Zellstruktur und Größe der ARMAN-Zellen analysiert. Aus diesen Bildern wird auf eine ellipsoide Zellform geschlossen, mit mittleren Werten der drei Achsen von 402 nm, 442 nm und 312 nm, was einem Volumen von minimal 0,009 μm³ bis maximal 0,062 μm³ entspricht (im Mittel 0,03 μm³-0,01 μm³) (Comolli *et al.*, 2009). Des Weiteren besitzen sie im Gegensatz zu den *Thermoplasmatales*, welche die andere Ordnung der Archaea in AMD Gebieten repräsentieren, eine Zellwand. Die mittlere Ribosomenanzahl pro Zelle liegt bei nur 92 (Comolli *et al.*, 2009). Außerdem wurde in den meisten Zellen eine röhrenförmige Struktur unbekannter Funktion gefunden. Das Genom der ARMAN ist mit knapp 1 Mbp (Baker *et al.*, 2010) fast doppelt so groß wie die Genome von *N. equitans* und

N. acidilobi. Da die ARMAN einige Gene besitzen, die bisher nur mit Crenarchaeota oder Bacteria in Verbindung gebracht wurden, geht man davon aus, dass sich die ARMAN früh abspalteten, zu der Zeit in der sich Cren- und Euryarchaeota trennten. Genom- und Proteom-Analysen, zeigen einen kompletten bzw. annähernd kompletten Citratzyklus für ARMAN-2, -4 und -5. Allerdings konnten ausschließlich in den Genomen von ARMAN-4 und -5 weitere Evidenzen für glykolytische Stoffwechselwege, den Pentosephosphatweg und den Glycerinmetabolismus detektiert werden. In ARMAN-2 wurden hingegen Gene zum Abbau von Fettsäuren über die β -Oxidation gefunden. Es wurde davon ausgegangen, dass ARMAN aerob leben, da eine hoch exprimierte Succinat-Dehydrogenase in allen drei Genomen gefunden wurde, ebenso wie Gene für eine Superoxid-Dismutase, Peroxiredoxin-ähnliche Proteine und eine Alkylhydroperoxidreduktase, welche Schutzmechanismen gegen oxidativen Stress darstellen könnten. Jedoch wurde ein Vorkommen in ausschließlich anaeroben Bereichen festgestellt. Darüber hinaus sind ARMAN entgegen früherer Beobachtungen nicht nur vereinzelte Mitglieder einer diversen Gemeinschaft an Bakterien und Archaea in den acidophilen Biofilmen von AMD-charakterisierten Gebieten (Baker *et al.*, 2010; Méndez-García *et al.*, 2014), sondern können in unter Wasser liegenden AMD-Biofilmen bis zu 25 % der mikrobiellen Gemeinschaft ausmachen (Justice *et al.*, 2012), was ihnen eine markante Rolle innerhalb dieser Biozöosen zuspricht.

Die Frage, ob ARMAN ebenso wie die anderen bisher kultivierten ultrakleinen Archaeen parasitisch leben, ist aufgrund uneindeutiger Datenlage bisher nicht zu beantworten. So wurden Merkmale der ARMAN-Genome, wie ungewöhnlich kurze Gene, eine hohe Gendichte, die geringe Genomgröße und überlappende Gene als Merkmale gedeutet, die die ARMAN mit anderen Wirt-assoziierten oder parasitischen Organismen gemein haben (Baker *et al.*, 2010). Aus 3D Kryo-elektronentomografischen Bildern konnte in den meisten Fällen jedoch kein direkter Kontakt von ARMAN-Zellen zu anderen Organismen der Biofilme festgestellt werden. Jedoch zeigten einige Bilder vereinzelte *Thermoplasmatales* welche die Zellwand der ARMAN penetrierten (Abb. 1-7).

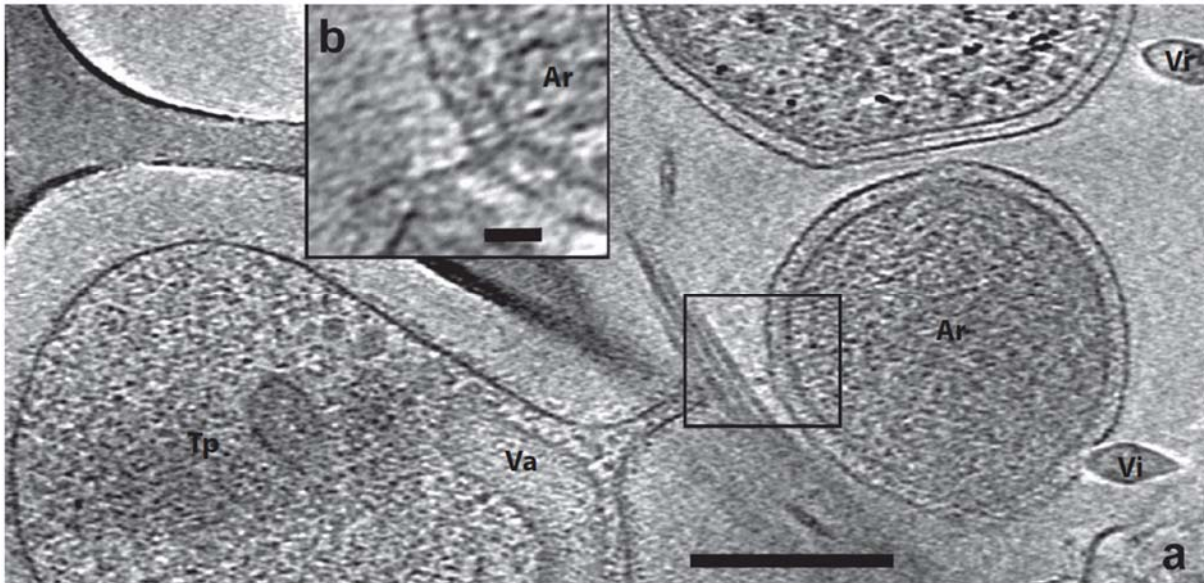


Abb. 1-7: Kryo-elektronentomografische Rekonstruktion, welche die Interaktion einer den *Thermoplasmales* zuzuordnenden Zelle (Tp) mit einer ARMAN-Zelle (Ar) zeigt. Maßstabsbalken in (a) 300 nm und in (b) 50 nm. (Aus Baker *et al.*, 2010).

Eine weitere Schwierigkeit stellt die Tatsache dar, dass 25-38 % aller detektierten Gene keinen Hit in den öffentlichen Datenbanken zeigen, wodurch eine eindeutige Aussage über die physiologischen Fähigkeiten der ARMAN zurzeit schwer zu treffen ist.

1.5 Herausforderungen bei der Kultivierung unkultivierbarer Mikroorganismen

Das Phänomen der Unkultivierbarkeit vieler Prokaryoten unter Laborbedingungen ist schon seit langem bekannt. So prägten Staley and Konopka bereits 1985 den Begriff der „Great Plate Count Anomaly“, welche die große Diskrepanz der Anzahl mikroskopierter Mikroorganismen einer Umweltprobe zur weitaus geringeren Anzahl der Organismen aus der gleichen Probe beschreibt, welche durch Plattierungsversuche isoliert werden konnten. Ausgehend von diesen Beobachtungen schloss man, dass je nach Habitat nur 1 % aller Prokaryoten kultiviert werden könnten. Durch den Einsatz moderner Techniken, wie der Metagenom- und Metatranskriptom-Analyse oder der 16S rDNA Analyse von Umweltproben, schoss die Anzahl bekannter Bakterienstämme in die Höhe und schon 2007 waren über 85 neue Bakterienstämme bekannt, von denen ein Großteil nicht einen kultivierten Verwandten innehatte (Achtman and Wagner, 2008). Dieses Phänomen ist auf die komplexen und teilweise unbekanntenen Bedingungen zurückzuführen, denen ein Organismus in seiner Umwelt ausgesetzt ist und die unter Laborbedingungen nur begrenzt

nachzustellen sind. So sind die anfangs unbekannt optimalen Wachstumsbedingungen wie beispielsweise pH-Wert, Temperatur, Salzgehalt, Redoxpotential oder Sauerstoffkonzentration ebenso unbekannt wie die Generationszeit zu den unterschiedlichen Parametern und können bestenfalls aus dem Ursprungshabitat annähernd abgeleitet werden. Dies sind die einfachsten im Labor nachzustellenden Parameter. Interaktionen der Organismen mit abiotischen oder biotischen Faktoren des natürlichen Habitats oder mit anderen Mikroorganismen, sowie mögliche hemmende Substanzen im angebotenen Medium sind hierbei noch nicht berücksichtigt. Ein prominentes Beispiel für solche Art von Abhängigkeit fanden D'Onofrio *et al.* (2010), welche eine Reihe bis dato unkultivierbarer Bakterienarten mithilfe von „Helferstämmen“ kultivierten, die Siderophore als Wachstumsfaktor produzierten. Um die bisher beschriebenen Probleme zu lösen, müssen daher neue Isolierungsstrategien gefunden werden. Beispiele solch neuer Isolationsstrategien sind u.a. die Nutzung von Mikromanipulatoren oder optischen Pinzetten zur Trennung von Mikroorganismen aus einer Mischkultur (Fröhlich and König, 2000). Aber auch Methoden, welche die natürlichen Bedingungen nachspielen, finden immer mehr Verwendung. Ein Beispiel ist die Verwendung von semipermeablen Membranen mit einer Porengröße von 0,03 μm , welche zwar Nährstoffe aus der Umgebung zu den zu kultivierenden Zellen lassen, aber undurchlässig für die Zellen selbst sind (Kaeberlein *et al.*, 2002). Ein anderes ist der „ichip“, welcher die Kultivierung einzelner Zellen in ihrer natürlichen Umgebung erlaubt (Nichols *et al.*, 2010). Eine weitere dieser Kultivierungsmethoden ist ein von Silla Hansen (Institut für Biologische Grenzflächen I (IBG I) des KIT) entwickelter Silikonchip zur Kultivierung und Charakterisierung von Mikroorganismen. Ziel dieser neuen Kultivierungsplattform ist die Auftrennung einer Mischkultur von Mikroorganismen über die Länge des mäanderförmigen Kanals, aufgrund von aktiv oder passiv angelegten Gradienten.

1.6 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war es, ein Konsortium aus acidophilen Archaea und einem acidophilen Pilz anzureichern, zu charakterisieren und die einzelnen Mitglieder dieser Ko-Kulturen zu isolieren. Ein besonderes Augenmerk sollte dabei auf die in den Ko-Kulturen vorkommenden, bisher unkultivierten ultrakleinen Archaea gelegt werden.

Hierfür sollten die Ko-Kulturen erst mittels 454-Sequenzierung auf ihre phylogenetische Zusammensetzung untersucht werden. Nachdem die Ko-Kulturen nur noch aus Archaea und einem Pilz bestanden, sollten in einem nächsten Schritt über die Analyse des Metagenoms und Metatranskriptoms genauere Einblicke in die physiologischen Vorgänge der einzelnen Organismen der Ko-Kulturen erhalten werden. Ein Vergleich der Genome untereinander und mit nah verwandten Organismen sollte die phylogenetische Abgrenzung der einzelnen Archaea festigen und Unterschiede bzw. Gemeinsamkeiten der Organismen hervorbringen, sowie die Abläufe der zentralen Stoffwechselwege klären.

Ein zentrales Ziel dieser Arbeit war außerdem zu klären, ob und in wie weit die in den Ko-Kulturen vorkommenden ultrakleinen Archaea in Abhängigkeit zu anderen Organismen stehen.

Die Analyse von Timelines mittels qPCR und Bestimmung der Fe^{3+} -Reduktion in Verbindung mit CARD-FISH Bildern unter verschiedenen Kultivierungsbedingungen sollten weitere Einblicke in die Dynamiken innerhalb der Ko-Kulturen ermöglichen.

Durch verschiedenste Isolierungsmethoden sollten weiterhin einzelne Organismen der Ko-Kulturen vereinzelt werden. Diese Isolate sollten genutzt werden, um mögliche Abhängigkeiten der einzelnen Mitglieder der Ko-Kulturen zu analysieren.

2 Material

2.1 Kulturen und Bakterienstämme

Die in dieser Arbeit verwendeten Anreicherungskulturen acidophiler Archaeen entstammen ursprünglich acidophiler, Stalaktit-ähnlicher Biofilme aus dem ehemaligen Pyritbergwerk „Drei Kronen und Ehr“ im Harz (Ziegler *et al.*, 2009; Ziegler *et al.*, 2013). Teile solcher Stalaktit-ähnlicher Biofilme wurden direkt in dem in Kapitel 3.1.1 beschriebenen Medium angeimpft und die angewachsenen Ko-Kulturen mehrfach überimpft, bis sie in dieser Arbeit weitere Anwendung fanden.

Für die Klonierung (siehe Kapitel 3.2.12) wurde *E. coli* DH5alphaZ1 verwendet.

2.2 Kultivierungsplattformen

Für die Rekultivierung der Anreicherungskulturen im Biofilm wurden spezielle mikrofluidische Fließzellen benutzt. Diese wurden von Silla Hansen vom Institut für Biologische Grenzflächen I (IBG I) des KIT designt. Die Kultivierungsplattform wurde von Tobias Kabbeck (IBG I) im Rahmen einer in dieser Arbeit betreuten Masterarbeit weiterentwickelt.

Die Fließzellen bestanden aus einem Silikongrundkörper mit den Maßen eines Standard-Objektträgers (76 × 26 mm), in den ein mäanderförmiger Kanal mit 13 Windungen eingebettet war (Abb. 2-1). Mit einer Höhe von 0,5 mm, einer Breite von 1 mm und 269,9 mm Länge fasste der Kanal 159,17 µl Medium. Dabei hatte jeder Kanal an den Enden je eine vorgelegte Kammer mit einem Volumen von je 5,36 µl. Um den nach oben offenen Kanal zu schließen, wurde ein passendes Deckglas kovalent auf den Silikongrundkörper gebunden. Der Kanal hatte an drei Stellen Zugänge für eine Kanüle mit einem Durchmesser von 0,8 mm, über die ein Schlauchsystem mit den mikrofluidischen Fließzellen verbunden werden konnte.

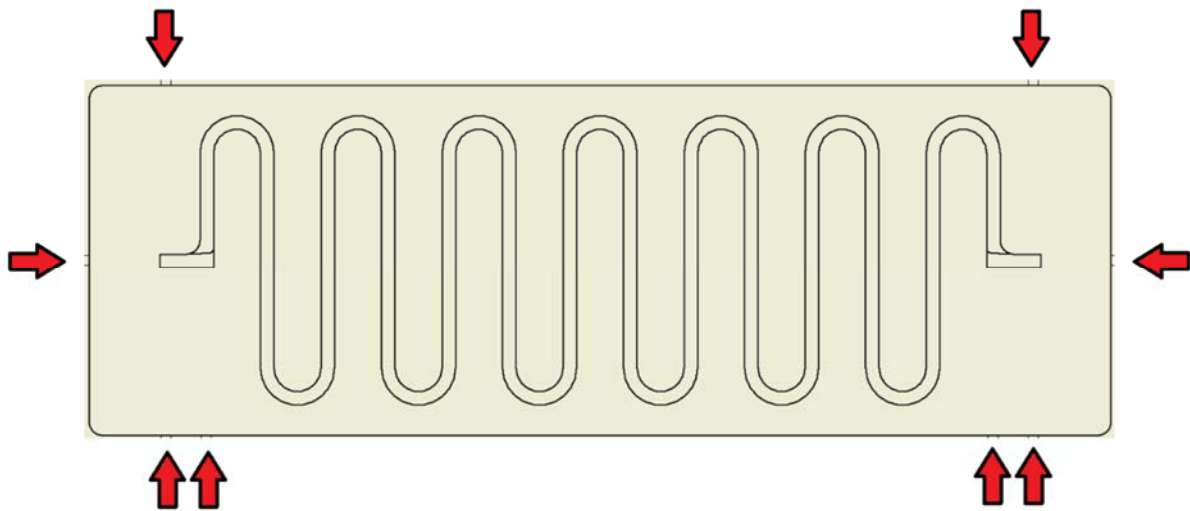


Abb. 2-1: Schema einer mikrofluidischen Fließzelle. (Abbildung: T. Kabbeck).

2.2.1 Fertigung der mikrofluidischen Fließzellen

Für die Fertigung des Silikongrundkörpers wurde das Sylgard® 184 Silicone Elastomer Kit (Dow Corning GmbH, Wiesbaden) entsprechend der Herstellerangaben angemischt und für ca. 1 Stunde in einem Exsikkator mit angeschlossener Vakuumpumpe entgast. 6 g des entgasten Silikongemischs wurden in eine speziell aus Messing angefertigte Negativform des Silikongrundkörpers gefüllt und für 2 Stunden bei 60 °C ausgehärtet. Entsprechend platzierte Kanülen mit einem Durchmesser von 0,6 mm dienten als Platzhalter für die späteren Zugänge.

Der an einer Seite offene Kanal des entformten Silikongrundkörpers wurde nach einer darauffolgenden Sauerstoff-Plasmabehandlung (Plasmaanlage Plasma Flecto 10, plasma technology GmbH, Herrenberg-Gültstein) kovalent an ein Deckglas (76 × 26 × 0,17 mm) gebunden (2 Minuten, 20 sccm, 300W). Eine nachfolgende Inkubation bei 100 °C für 5 Minuten sollte die Bindung zwischen Deckglas und Silikon erhöhen.

2.2.2 Versuchsaufbau

Da die zu kultivierenden Archaeen ausschließlich im anaeroben Bereich des Ursprungsbiofilms zu finden waren, fand auch die Kultivierung in der Fließzelle unter anaeroben Bedingungen statt.

Hierfür wurden eigens von Silla Hansen und Tobias Kabbeck konstruierte Kammern aus Polycarbonat (Makrolon® GP klar, Covestro AG, Leverkusen) von der Feinmechanischen Werkstatt des Instituts für Physikalische Chemie am KIT gefertigt. Diese waren perfekt auf die Fließzellen angepasst und über Anschlüsse im Deckel zu begasen. Abb. 2-2 zeigt den Grundaufbau einer solchen Kammer und deren Einzelkomponenten.

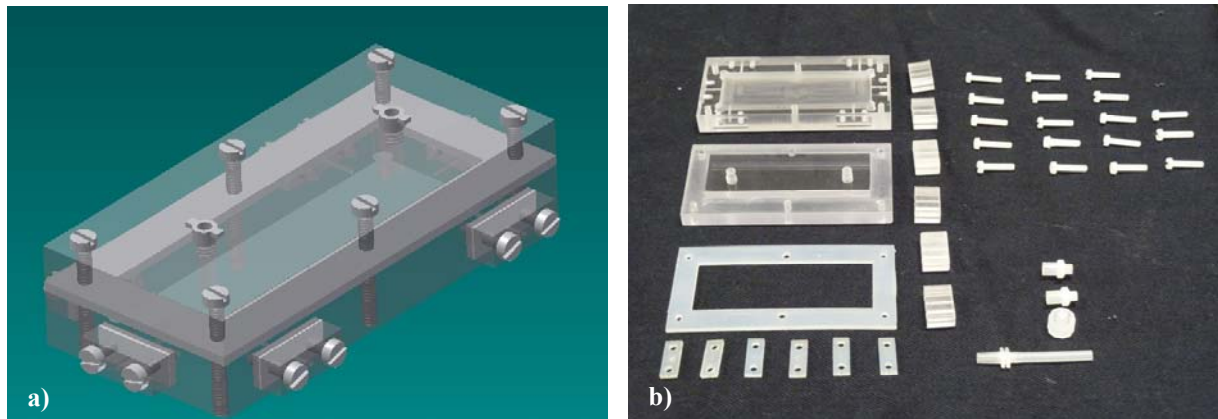


Abb. 2-2: a) Schematische Darstellung einer zusammengebauten Kammer mit allen zugehörigen Komponenten. b) Einzelkomponenten einer Kammer zur Begasung der mikrofluidischen Fließzellen. Erklärungen siehe Text. (Abbildungen: T. Kabbeck.)

Eine Kammer bestand aus einem Grundkörper mit Deckel und seitlichen Stabilisatoren, zur Führung der Kanülen, aus Makrolon®. Zum Abdichten der Kammern dienten speziell angefertigte Dichtungen aus Silikon (60 Shore, 2 mm Dicke) zwischen Deckel und Grundkörper und Grundkörper und Stabilisatoren. Verschraubt wurden die Kammern mit autoklavierbaren Polyamid-Schrauben. Spezielle Bohrungen für die Kanülen an den Seiten der Kammern und an den Stabilisatoren stellten die Verbindung zum Schlauchsystem sicher.

Um die Versorgung der in den Fließzellen wachsenden Organismen mit Medium sicherzustellen, wurden diese über angeschlossene Kanülen mittels Luer Lock-Verbinder mit Silikonschläuchen (Rotilabo-Silikonschlauch, Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe) mit einem Innendurchmesser von 1,5 mm verbunden. Diese waren wiederum mit entsprechendem Medium oder Inokulum gefüllten Spritzen verbunden, welche in eine Spritzenpumpe eingespannt wurden. Dies erlaubte eine konstante und präzise einstellbare Fließgeschwindigkeit des Mediums/Inokulums. Die Einbindung eines Luer Lock T-Stücks (BD Connecta™ 3-Wege-Hahn, Becton Dickinson and Company, New Jersey, USA) erlaubte das Umschalten des Medienflusses zwischen Fließzelle und einer separaten Schottflasche, die zum Sammeln des Durchlaufs diente. Diese Verschaltung sollte sicherstellen, dass nach

Mediumswechsel, bzw. vor der Inokulation keine Luftblasen in die Fließzelle gelangen konnten. Die sich nach dem Anschluss der Spritzen sammelnden Luftblasen konnten so über das T-Stück in den Sammelbehälter geleitet werden. Erst wenn die Silikonschläuche völlig mit Medium gefüllt waren, wurde der Fluss wieder auf die Fließzellen umgeschaltet.

Um zu gewährleisten, dass das System vor dem Animpfen steril war, wurden die Schläuche und Luer Lock Verbinder, bis auf die nicht autoklavierbaren T-Stücke, zusammengesteckt und autoklaviert. Die Fließzellen wurden in die vollständig zusammengebauten Kammern gelegt. Die Kanülen zum Verbinden der Kammern mit den Schlauchsystemen wurden ebenfalls schon gesetzt, am Ende mit einem Luer-Stopfen verschlossen und als Ganzes autoklaviert. Die anschließende Verbindung der Fließzellen an die Schlauchsysteme mithilfe der sterilen T-Stücke fand unter einer Sterilbank statt.

2.3 Plasmide

Für die Klonierung von Markersequenzen einzelner Archaeenarten zur Analyse über qPCR wurde das Plasmid pAH95 und das entsprechende Helferplasmid pAH121 verwendet.

2.4 Primer

Alle in dieser Arbeit verwendeten Primer sind in Tabelle 2-1 aufgeführt und wurden bei der Firma Sigma-Aldrich Biochemie GmbH (Hamburg) synthetisiert.

Tab. 2-1: Verwendete Primer.

Bezeichnung	Sequenz	Verwendung
ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	Universeller forward Primer für 5,8S rDNA Detektion und benachbarter ITS DNA-Sequenzen von Pilzen (White <i>et al.</i> , 1990)
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	Universeller reverse Primer für 5,8S rDNA Detektion und benachbarter ITS DNA-Sequenzen von Pilzen (White <i>et al.</i> , 1990)
IMG_M_Pr1-6_A_rev	CCTATCCCCTGTGTGCCTTGGCAGTC_TCA G_GACGGGCRGTGTGTRCAA	Allgemeiner reverse Primer für 16S rDNA von Archaea mit Adaptoren für die 454-Sequenzierung (Geiger, 2016)
IMG_M_Pr5_MID5_A_for	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGAC_TCA G_ATCAGACACG_AGGAATTGGCGGGG AG	Allgemeiner forward Primer für 16S rDNA von Archaea mit Adaptoren für die 454-Sequenzierung (Geiger, 2016)

IMG_M_Pr7-12_B_rev	CCTATCCCCTGTGTGCCTTGGCAGTC_TCA G_GACTACHVGGGTATCTAATCC	Allgemeiner reverse Primer für 16S rDNA von Bacteria mit Adaptoren für die 454-Sequenzierung (Geiger, 2016)
IMG_M_Pr11_MID11_B_for	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGAC_TCA G_TGATACGTCT_CCTACGGGNGGCWGC AG	Allgemeiner forward Primer für 16S rDNA von Bacteria mit Adaptoren für die 454-Sequenzierung (Geiger, 2016)
Fusions-primer for	GTGTTTTACGCCGCATCC	Forward Fusionsprimer für A_DKE und <i>Thermoplasmatales</i> -Sequenzen (diese Arbeit)
Fusions-primer rev	CAGTGATAAGCTGTCAAACATGAG	Reverse Fusionsprimer für A_DKE und <i>Thermoplasmatales</i> -Sequenzen (diese Arbeit)
A_DKE Klonierungs-primer for	GTGTTTTACGCCGCATCCGGCATTACAAA ATGACTTTGTAAACGCGTGGATCCCTTAG TACAGTGGGTGACGC	Forward Klonierungsprimer für A_DKE (diese Arbeit)
A_DKE Klonierungs-primer rev	CAGACGACATCGAAGTAGCAAACCTATG GTTGGGACAGTGAACAATC	Reverse Klonierungsprimer für A_DKE (diese Arbeit)
Thermo Klonierungs-primer for	TGGCGTAACGATTGTTCCACTGTCCCAAC CATAGGGTTTGCTACTTCGA	Forward Klonierungsprimer für <i>Thermoplasmatales</i> (diese Arbeit)
Thermo Klonierungs-primer rev	CAGTGATAAGCTGTCAAACATGAGAATTC GAGCTCCGTTCTCTCGTACTAAAGGC	Reverse Klonierungsprimer für <i>Thermoplasmatales</i> (diese Arbeit)
A_DKE qPCR for	CTTAGTACAGTGGGTGACGC	Forward qPCR Primer für A_DKE (diese Arbeit)
A_DKE qPCR rev	GGTTGGGACAGTGAACAATC	Reverse qPCR Primer für A_DKE (diese Arbeit)
Thermo qPCR for	GGGTTTGCTACTTCGATGTCG	Forward qPCR Primer für <i>Thermoplasmatales</i> (diese Arbeit)
Thermo qPCR rev	CGTTCCTCTCGTACTAAAGGC	Forward qPCR Primer für <i>Thermoplasmatales</i> (diese Arbeit)
Arch20F	TTCCGGTTGATCCYGCCRG	Universeller forward Primer für 16S rDNA von Archaea (Massana and Murray, 1997)
Uni1406R	GACGGGCRGTGTGTRCAA	Universeller reverse Primer für 16S rDNA von Prokaryoten (Kato <i>et al.</i> , 2009)
B_DKE for	CCTGTTGAAAGATAGGGGAG	Forward Primer zur Detektion der 23S rDNA von B_DKE (diese Arbeit)
B_DKE rev	GGAATGGAGTGAATACCCAG	Reverse Primer zur Detektion der 23S rDNA von B_DKE (diese Arbeit)
C_DKE for	GTGTATGGACTCTTCCCAAC	Forward Primer zur Detektion der 23S rDNA von C_DKE (diese Arbeit)

C_DKE rev	GCAAGTGACTCCCCTTATC	Reverse Primer zur Detektion der 23S rDNA von C_DKE (diese Arbeit)
Uni1510R	GGTACCTGTTACGACTT	Universeller reverse Primer zur Detektion von Bacteria und Archaea (Eid <i>et al.</i> , 2009)
Bac27F	GAGTTTGATCCTGGCTCA	Universeller forward Primer zur Detektion von Bacteria und Archaea (Rainey <i>et al.</i> , 1992)

2.5 HRP-Sonden

Die in dieser Arbeit verwendeten Sonden für CARD-FISH (catalyzed reporter deposition fluorescence *in situ* hybridisation) Experimente sind in Tabelle 2-2 aufgeführt.

Tab. 2-2: Verwendete HRP-Sonden.

Sonde	Ziel	Sequenz von 3' nach 5'	Formamid-konz. [%]	Spezifität	Referenz
Arch915	16S	GTGCTCCCCGCCAATTCCT	20	Archaea	(Stahl und Amann, 1991)
Arm980	16S	GCCGTCGCTTCTGGTAAT	30	ARMAN	(Baker <i>et al.</i> , 2006)

Die CARD-FISH- Sonden wurden bei der Firma Biomers.net GmbH (Ulm) synthetisiert. Die Aufreinigung der Oligonukleotide erfolgte über Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE). Als Besonderheit haben CARD-FISH Sonden ein HRP-(horseradish peroxidase) Konjugat mit Peroxidaseaktivität an das 5'-Ende gekoppelt. Die Sonden wurden mit nukleasefreiem Reinstwasser auf eine Endkonzentration von 50 ng/µl verdünnt und aliquotiert eingefroren. Da wiederholtes Einfrieren und Auftauen dem an die Sonden gekoppelten Enzym schaden würden, erfolgte die Lagerung der Aliquots nach einer ersten Nutzung bei 4 °C.

2.6 Tyramid-Konjugate

Die verwendeten Tyramid Konjugate lagen zum Zeitpunkt der Arbeit bereits vor und wurden ursprünglich nach dem Protokoll von Pernthaler *et al.* (2004) hergestellt.

2.7 Chemikalien, Enzyme und Kits

Soweit nicht anders angegeben, wurden in dieser Arbeit verwendete Chemikalien bei den Firmen Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe), VWR International GmbH (Darmstadt), Merck KGaA (Darmstadt), AppliChem GmbH (Darmstadt) und Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim), bestellt.

Verwendete Enzyme, Kits und Farbstoffe sind in nachfolgender Tabelle (Tab. 2-3) zu entnehmen.

Tab. 2-3: Verwendete Kits, Enzyme und Chemikalien.

Produkt	Firma
<i>BamHI</i> HF	Bio-Rad Laboratories GmbH (München)
<i>SacI</i> HF	Bio-Rad Laboratories GmbH (München)
innuSPEED Soil DNA Kit	Analytik Jena (Jena)
Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System	Promega (Mannheim)
Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System	Promega (Mannheim)
TRIzol® Max™ Bacterial RNA Isolation Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
DNA-free™ DNA Removal Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix	Bio-Rad Laboratories GmbH (München)
MangoMix™	Bioline (Luckenwalde)
iProof™ High-Fidelity DNA Polymerase	Bio-Rad Laboratories GmbH (München)
T4-Ligase	New England BioLabs GmbH (Frankfurt a.M.)
GeneRuler 1 kb DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific (Schwerte)
GeneRuler 50 bp DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific (Schwerte)
Midori Green Advance	Biozym Scientific GmbH (Hessisch Oldendorf)
DNA Gel Loading Dye (6×)	Thermo Fisher Scientific (Schwerte)
Ferrozine (Dinatrium-4,4'-(3-(pyridin-2-yl)-1,2,4-triazin-5,6-diyl)bis(benzolsulfonat))	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)
Alexa488-succinimidyl-ester	Life Technologies (Darmstadt)
Alex546-succinimidyl-ester	Life Technologies (Darmstadt)
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	AppliChem (Darmstadt)

3 Methoden

3.1 Kultivierungsmethoden

3.1.1 Medium für die Archaeenanreicherung

Als Grundmedium für die Anreicherung acidophiler Archaeen diene ein Medium, welches sich für die Kultivierung der häufigsten Archaeenarten des nativen Biofilms, der *Thermoplasmatales* (Ziegler *et al.*, 2013), bewährt hat (Tab. 3-1). Ursprünglich diene dieses Medium für die Kultivierung von *Picrophilus* spp. (Huber and Stetter, 2001). Dieses Grundmedium wurde durch die Zugabe von Caseinhydrolysat und Fe(III)SO₄ ergänzt.

Tab. 3-1: Picrophilus Medium.

Substanz	Menge	Endkonzentration
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,20 g/l	1,51 mM
MgSO ₄ *7 H ₂ O	0,50 g/l	2,03 mM
CaCl ₂ *2 H ₂ O	0,25 g/l	1,70 mM
Hefeextrakt (10 % w/v)	11,1 ml/l	0,1 %
Caseinhydrolysat (10 % w/v)	11,1 ml/l	0,1 %
Fe ₂ (SO ₄) ₃	88,8 mml/l	20 mM
Wolfe´s mineral elixier (1000 fach) (Tab. 3-2)	2 ml	-
Vitaminlösung (100 fach) (Tab. 3-3)	2 ml	-

Der pH-Wert wurde mittels H₂SO₄ auf 2,5 eingestellt.

Die Salzlösung wurde autoklaviert, hitzeempfindliche Substanzen, wie Hefeextrakt, Caseinhydrolysat, Fe(III)SO₄, Vitamine und Antibiotika, dagegen sterilfiltriert (Filtropur S 0,2 µm (Sarstedt, Nümbrecht)) und anschließend komplementiert.

Tab. 3-2: Wolfe´s mineral elixier (1000-fach) Spurenelemente-Stammlösung (DSMZ).

Substanz	Menge	Endkonzentration
MgSO ₄ *7 H ₂ O	30,00 g/l	121,71 mM
MnSO ₄ *H ₂ O	5,00 g/l	29,58 mM
NaCl	10,00 g/l	171,12 mM
FeSO ₄ *7 H ₂ O	1,00 g/l	3,60 mM
CoCl ₂ *6 H ₂ O	1,80 g/l	7,57 mM
CaCl ₂ *2 H ₂ O	1,00 g/l	6,80 mM
ZnSO ₄ *7 H ₂ O	1,80 g/l	6,26 mM
CuSO ₄ *5 H ₂ O	0,10 g/l	0,41 mM
KAl(SO ₄) ₂ *12 H ₂ O	0,18 g/l	0,38 mM
H ₃ BO ₃	0,10 g/l	1,62 mM
Na ₂ MoO ₄ *2 H ₂ O	0,10 g/l	0,41 mM
(NH ₄) ₂ Ni(SO ₄) ₂ *6 H ₂ O	2,80 g/l	7,09 mM
Na ₂ WO ₄ * 2 H ₂ O	0,10 g/l	0,30 mM
Na ₂ SeO ₄	0,10 g/l	0,53 mM

1l ddH₂O wurde mittels H₂SO₄ auf pH 1 eingestellt. Anschließend wurden die entsprechenden Salze darin gelöst und sterilfiltriert

Tab. 3-3: Vitaminlösung (100-fach) (aus DSMZ Medium 1116).

Substanz	Menge	Endkonzentration
Vitamin B12	50 mg/l	0,04 mM
Pantothersäure	50 mg/l	0,23 mM
Riboflavin	50 mg/l	0,13 mM
Pyridoxamin-HCl	10 mg/l	0,03 mM
Biotin	20 mg/l	0,08 mM
Folsäure	20 mg/l	0,06 mM
Nicotinsäure	25 mg/l	0,20 mM
Nicotinamid	25 mg/l	0,20 mM
(R)-Liponsäure	50 mg/l	0,24 mM
p-Aminobenzoessäure	50 mg/l	0,36 mM
Thiaminhydrochlorid	50 mg/l	0,15 mM

Die Vitamine wurden in 1l ddH₂O gelöst und anschließend sterilfiltriert.

Alle Glas- und Plastikbehälter, die zum Ansetzen der Medien bzw. zur Kultivierung der Kulturen genutzt wurden, wurden vor der Nutzung und nach dem Waschen in einer handelsüblichen Laborspülmaschine nochmals per Hand einem Säurebad in verdünnter H_2SO_4 unterzogen und abschließend mit dH_2O gespült. Somit sollte sichergestellt werden, dass keinerlei Verunreinigungen in die Kulturen gelangen konnten.

3.1.2 Anaerobes Arbeiten

Da die anzureichernden Archaeen lediglich im anaeroben Bereich des nativen Biofilms zu finden waren (Ziegler *et al.*, 2013), wurde ausschließlich anaerob kultiviert. Für die Herstellung des Mediums wurde zuerst die Salzlösung nach dem Einstellen des pH-Wertes aufgeköcht, auf Raumtemperatur abgekühlt und anschließend für 30 Minuten mit N_2/CO_2 (80 % : 20 %) unter Rühren begast und autoklaviert. Alle zu komplementierenden Substanzen wurden sterilfiltriert und anschließend für mindestens 20 Minuten (volumenabhängig) anaerobisiert. Hierbei wird eine mit einem Stopfen verschlossene Flasche abwechselnd mit 0,5 bar N_2 begast und mit -1,5 bar evakuiert, wobei die Flaschen ständig geschüttelt werden. Somit soll sichergestellt werden, dass das in der Flüssigkeit gelöste Gas nach und nach durch N_2 ersetzt wird. Die zu komplementierenden Lösungen wurden nach dem Autoklavieren der Salzlösung entweder mit einer Spritze zu dem Medium gegeben, oder über einen Adapter per Gasdruck direkt in die Mediumsflasche geleitet. An diese speziellen, zuvor autoklavierten Edelstahladapter können zwei Kanülen angebracht werden, wodurch zwei mit einem Gummistopfen versehene Schottflaschen miteinander verbunden werden können. Die Schottflasche mit der gewünschten Komplementationsflüssigkeit wird mit Hilfe einer Kanüle und einem dazwischen geschalteten Sterilfilter Filtropur S 0,2 μm (Sarstedt, Nümbrecht) an die N_2/CO_2 (80 % : 20 %)-Begasung angeschlossen. Der Druckausgleich erfolgt nun über eine Kanüle welche über den Edelstahladapter mit einer anderen Kanüle verbunden ist. Diese wird wiederum mit der Mediumsflasche verbunden. Der Druckausgleich erfolgt hier durch eine normale Kanüle. Durch den Gasfluss kann nun die Flüssigkeit aus der ersten Schottflasche anaerob und steril in die Mediumsflasche überführt werden.

Das komplementierte Medium wurde vor der Inokulation in Hungates abgefüllt und anschließend für mindestens 20 Minuten mit H_2/CO_2 (80 % : 20 %) begast. Da im Ausgangsbiofilm Hinweise auf methanogene Aktivitäten in Form von Sulfonsäuren gefunden

wurden, sollte so die Versorgung mit Wasserstoff für potentielle methanogene Archaea sichergestellt werden.

Die Verwendung von Fe(III)SO_4 machte eine Zugabe von Reduktionsmitteln nicht möglich. Um ein strikt anaerobes Wachstum der Archaeen zu prüfen, wurde daher ein Medium vollständig in einem Anaerobenzelt mit zuvor aufgekochtem und mit N_2/CO_2 (80 % : 20 %) begastem ddH₂O angesetzt. Alle anschließenden Arbeitsschritte wurden ausnahmslos im Anaerobenzelt durchgeführt, um eine Kontamination mit Sauerstoff ausschließen zu können.

3.1.3 Medium für die Kultivierung acidophiler Pilze

Zur Isolation und Kultivierung des in den Anreicherungskulturen vorkommenden Pilzes wurde ein Medium verwendet, welches schon von Baker *et al.* (2004) für die Kultivierung acidophiler Pilze aus sauren Minen Verwendung fand (Tab. 3-4).

Tab. 3-4: Medium zur Kultivierung acidophiler Pilze.

Substanz	Menge	Endkonzentration
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0,80 g/l	6,05 mM
KH_2PO_4	0,40 g/l	2,94 mM
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,16 g/l	0,65 mM
Hefeextrakt	0,2 g/l	0,02 %
Glucose	1,2 g/l	6,6 mM
SL 10 (1000-fach) (Tab. 3-5)	2 ml	-

Der pH-Wert wurde mittels H_2SO_4 auf 2,0 eingestellt.

Tab. 3-5: SL 10 (1000-fach).

Substanz	Menge	Endkonzentration
HCl (25 %)	10 ml/l	
FeCl ₂ × 4 H ₂ O	1,50 g/l	7,54 mM
ZnCl ₂	0,07 g/l	0,51 mM
MnCl ₂ × 4 H ₂ O	0,1 g/l	0,5 mM
H ₃ BO ₃	0,006 g/l	0,1 mM
CoCl ₂ × 6 H ₂ O	0,19 g/l	0,8 mM
CuCl × 2 H ₂ O	0,002 g/l	0,01 mM
NiCl ₂ × 6 H ₂ O	0,024 g/l	0,1 mM
Na ₂ MoO ₄ × 2 H ₂ O	0,036 g/l	0,15 mM
ddH ₂ O	990 ml	-

Die Salzlösung wurde autoklaviert, hitzeempfindliche Substanzen sterilfiltriert.

3.1.4 Isolierungsstrategien

Um das Wachstum im Biofilm vorkommender Bakterien zu hemmen, erfolgte zu Anfang der Kultivierung der aus dem Biofilm angeimpften Ko-Kulturen eine zusätzliche Beigabe unterschiedlicher Antibiotika (Tab. 3-6). Nachdem keine Bakterien-DNA mehr per PCR und 454 Sequenzierung nachweisbar war, wurde die Antibiotikazugabe eingestellt.

Der in den Kulturen enthaltene Pilz sollte zunächst mithilfe von Fungiziden (Tab. 3-6) eliminiert werden. Ein weiterer Ansatz war die Filtration der Anreicherungskulturen mit Sterilfiltern unterschiedlicher Porengrößen (0,45 µm, Rotilabo®-Spritzenfilter, CME, (Roth, Karlsruhe), Filtropur S 0,2 µm (Sarstedt, Nümbrecht)), um die wesentlich kleineren Archaeen vom Pilz per Größenselektion zu trennen.

Tab. 3-6: Verwendete Antibiotika.

Antibiotikum	Arbeitskonzentration
Streptomycin	150 µg/ml
Kanamycin	50 µg/ml
Chloramphenicol	30 µg/ml
Vancomycin	2 µg/ml
Nystatin	50 µg/ml
Amphotericin	50 µg/ml
2-Aminobenzimidazol	50 µg/ml
Fenpropimorph	50 µg/ml
Cycloheximid	10 µg/ml - 25 µg/ml

Die entsprechenden Stocklösungen wurden sterilfiltriert.

Die Isolationsversuche mithilfe von verfestigten Medien wurden mit Agarose, Gelrite, Stärke nach Smithies und PhytaGel durchgeführt. Hierfür wurde das *Picrophilus*-Medium wahlweise mit 0,8 % Agarose, 0,6 % Gelrite oder 0,8 % PhytaGel verfestigt. Dabei war stets zu beachten, dass die Verfestigungsmittel separat vom eigentlichen Medium, welches doppelt konzentriert war, in der anderen Hälfte des benötigten ddH₂O autoklaviert wurden. Unter sauren Bedingungen autoklaviert würden die Medien nach dem Abkühlen nicht mehr auspolymerisieren. Nach dem Herunterkühlen der Lösungen auf 60 °C wurden diese komplementiert, miteinander vermischt und zügig in Petrischalen gegossen. Die Lösungen wurden stets anaerob angesetzt und nach der Komplementierung in ein Anaerobenzelt eingeschleust, gegossen und dort während des Auspolymerisierens inkubiert. Die Stärkeplatten wurden mit 10 % Stärke nach Smithies (Smithies, 1955) hergestellt. Hierbei wurde das *Picrophilus*-Medium direkt mit der Stärke vermischt und nach dem Autoklavieren sofort komplementiert und gegossen.

Die Isolation des Pilzes erfolgte mithilfe von Agar-Platten, für welche dem Grundmedium (Tab. 3-4) 20 g/l Agar zugesetzt wurden. Da es sich in diesem Fall um ein Medium mit saurem pH-Wert handelte, musste eine doppelt konzentrierte Salzlösung mit entsprechend eingestelltem pH-Wert getrennt vom Agar angesetzt werden, welcher im restlichen ddH₂O mit neutralem pH-Wert gelöst war. Um ein gleichmäßiges Auspolymerisieren der Platten zu

gewährleisten, wurden erst nach dem Autoklavieren beide Lösungen bei einer Temperatur von 50 °C gemischt, komplementiert und anschließend in Petrischalen gegossen.

3.1.5 Kultivierung von *E. coli* für die Klonierung

E. coli DH5al α hp α Z1 wurde in handelsüblichem LB Medium (Lysogeny Broth, Carl Roth, Karlsruhe) kultiviert.

Für den Klonierungsprozess war zeitweise eine Kultivierung in SOC-Medium (Tab. 3-7) bzw. eine Zugabe von Kanamycin (40 μ g/ml) oder Ampicillin (100 μ g/ml) erforderlich.

Tab. 3-7: SOC-Medium.

Substanz	Menge	Endkonzentration
Trypton	20 g/l	2 %
Hefeextrakt	5 g/l	0,5 %
NaCl	0,5 g/l	8,6 mM
KCl-Lösung	2,5 ml	2,5 mM
pH 7 mit 10 M NaOH → autoklavieren		
MgCl ₂ -Lösung (1 M)	10 ml	10 mM
Glucoselösung (1 M)	20 ml	20 mM

Die MgCl₂-Lösung und die Glucoselösung wurden sterilfiltriert und nach dem Autoklavieren komplementiert.

3.1.6 Kultivierungsbedingungen in der Fließzelle

Der Aufbau fand in einem Anaerobenzelt statt. Sechs Fließzellen wurden mitsamt den Schläuchen und Spritzen in das Anaerobenzelt geschleust und dort an eine Spritzenpumpe angeschlossen. Die Inokulation mit gut gewachsenen Anreicherungskulturen erfolgte mit einer Fließgeschwindigkeit von 1 μ l/min über zwei Tage. Danach wurde mit einer Flussrate von 1 μ l/min frisches, aerobes Medium angeschlossen. Nach erfolgter Inokulation wurde frisches Medium mit einer Flussrate von 2 μ l/min zugeschalten.

Da frühere Versuche gezeigt haben, dass Pilze des Ursprungsbiofilms gut in den Fließzellen wachsen, sollte mit komplettem Sauerstoffausschluss die Wahrscheinlichkeit gesenkt werden, dass der in den Anreicherungskulturen befindliche Pilz die Fließzellen bewächst.

Die Medium-enthaltenden Spritzen wurden regelmäßig gewechselt.

3.1.7 Kryokonservierung

Die Sicherung der Anreicherungskulturen erfolgte in 20 %-50 %-igem, sterilen Glycerin (v/v, in entsprechendem Ausgangsmedium der Kulturen). 1 ml aktive Kultur wurde abzentrifugiert, in entsprechender Glycerinlösung aufgenommen und in spezielle Cryo-Pure Gefäße (Sarstedt, Nümbrecht) gefüllt. Das sofortige Schockfrieren in flüssigem Stickstoff verringert zusammen mit dem zugesetzten Glycerin die Bildung von Eiskristallen. Die Gefrierkulturen wurden bei -80 °C bzw. über flüssigem Stickstoff bei -196 °C gelagert.

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 DNA Isolation

Bei der DNA-Isolation mit dem innuSPEED Soil DNA Kit von Analytik Jena werden Zellen sowohl chemisch, thermisch, als auch mechanisch aufgeschlossen, weshalb dieses Kit Anwendung bei der DNA-Isolation der Anreicherungskulturen für die qPCR Verwendung fand. Hierfür wurden je 500 µl einer Zellkultur abzentrifugiert, mit PBS Puffer (pH 2,5) gewaschen und das Pellet in 600 µl ELS aufgenommen. Bis zum Zeitpunkt der Auswertung erfolgte die Lagerung bereits entnommener Proben bei -20 °C. Die nachfolgenden Arbeitsschritte richteten sich nach dem Herstellerprotokoll, wobei die thermische Zellyse auf 40 min verlängert wurde und die mechanische Zellyse in einer Zelmühle Mixer Mill 400 (Retsch, Haan) für 7 Minuten bei 30 Hz erfolgte. Die DNA wurde in 40 µl Elutionspuffer eluiert.

Die DNA-Isolation des acidophilen Pilzes erfolgte streng nach einem Protokoll von Cenis (1992), wobei als Ausgangsmaterial 1,2 ml einer dicht gewachsenen Kultur dienten.

3.2.2 DNA-/RNA-Isolation für die Metgenomik/Metatranskriptomik

Die DNA-Isolation der Anreicherungskulturen für die Metagenomik richtete sich nach einem Protokoll von Lo *et al.* (2007). Als Ausgangsmaterial wurden insgesamt 2×8 ml aus gut gewachsenen Kulturen gewählt. Im Folgenden wurde streng nach Protokoll verfahren.

Die RNA-Isolation für die Metatranskriptomik wurde mit dem TRIzol® Max™ Bacterial RNA Isolation Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) durchgeführt. Als Ausgangsmaterial dienten insgesamt 8 ml aus gut angewachsenen Kulturen. Es wurde nach Herstellerprotokoll verfahren.

Die Aufreinigung der verbliebenen DNA erfolgte mit dem DNA-free™ DNA Removal Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) nach Herstellerangaben.

3.2.3 Aufreinigung von PCR Produkten

Die Aufreinigung von PCR Produkten aus dem PCR-Ansatz oder einem Agarosegel erfolgte streng nach Herstellerangaben des Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up Systems von Promega. Für die Elution der DNA wurden 25 µl bzw. 30 µl steriles ddH₂O verwendet.

3.2.4 Quantifizierung der DNA

Die mittels PCR amplifizierte DNA wurde über den NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, USA) quantifiziert. Hierzu wird 1 µl der zu messenden Probe bei einer Wellenlänge von 260 nm photometrisch gemessen und über die Absorption gegen eine Negativkontrolle der Gehalt an DNA kalkuliert.

3.2.5 Isolation von Plasmiden

Die Isolation von Plasmiden erfolgte mithilfe des Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega, Mannheim), bei dem die eingesetzten Zellen alkalisch lysiert werden und die chromosomale DNA durch eine anschließende Neutralisation gefällt wird. Die weitaus stabilere Plasmid DNA kann nachfolgend über eine Säule aufgereinigt werden. Die Isolation erfolgte streng nach Herstellerprotokoll.

3.2.6 PCR (Polymerasekettenreaktion)

Für den Nachweis von Archaeen, Bakterien und im Speziellen ARMAN und zur Gewinnung spezifischer DNA-Sequenzen für die Klonierung wurde die Polymerasekettenreaktion (PCR) verwendet. Hierbei werden spezifische DNA-Abschnitte mithilfe komplementärer Primer,

einer Polymerase und dNTPs amplifiziert. Die anschließende Gelelektrophorese erlaubt die Auftrennung der DNA-Abschnitte nach ihrer Größe.

Der einfache Nachweis spezifischer DNA erfolgte mit einer Taq-Polymerase. Diese ist neben allen anderen notwendigen Komponenten für die PCR bereits im MangoMix™ (Bioline, Luckenwalde) enthalten. Lediglich die Primer und die Template-DNA müssen in angegebener Konzentration hinzugefügt werden (Tab. 3-8).

Amplifikationen spezifischer DNA-Abschnitte für die Klonierung und die Amplifikation der DNA des acidophilen Pilzes machte den Einsatz der iProof™ High-Fidelity DNA Polymerase (Bio-Rad, München) erforderlich. Sie besitzt eine Proofreading-Funktion, was vor allem bei Anwendungen, welche exakte Amplifikationsergebnisse verlangen, notwendig ist. Sie ist 52-mal akkurater als eine Taq-Polymerase und kann Fragmente bis zu 37 kb amplifizieren. Standardansätze für beide Polymerasen sind in Tabelle 3-8 aufgeführt.

Tab. 3-8: Standardansätze für eine PCR.

Standardansatz Mango-PCR	
Substanz	Menge (30 µl Ansatz)
Mango Mix (2-fach)	15,0 µl
Primer forward (2 pmol/µl)	7,5 µl
Primer reverse (2 pmol/µl)	7,5 µl
Template DNA (<10 ng/µl)	1 µl
Standardansatz iProof-PCR	
Substanz	Menge (50 µl Ansatz)
5* iProof GC Buffer	10 µl
dNTP mix (10 mM)	1 µl
Primer forward (2 pmol/µl)	12,5 µl
Primer reverse (2 pmol/µl)	12,5 µl
Template DNA (~50 ng/µl)	1 µl
ddH ₂ O	11,5 µl
DMSO	1,5 µl
iProof DNA Polymerase	0,5 µl

Für die Amplifikation der DNA wurden die Thermal Cycler C1000™ und S1000™ genutzt. Die zugehörigen Programme sind Tabelle 3-9 zu entnehmen.

Tab. 3-9: Standardprogramme für eine PCR.

Standardprogramm Mango-PCR		
Schritt	Temperatur	Zeit
Einleitende Denaturierung	95 °C	5 min
Denaturierung	95 °C	30 sec
Annealing	55 °C	45 sec
Elongation	72 °C	1 min
Finale Elongation	72 °C	10 min
} 30-mal		
Standardprogramm iProof-PCR		
Schritt	Temperatur	Zeit
Einleitende Denaturierung	98 °C	30 sec
Denaturierung	98 °C	10 sec
Annealing	55 °C bzw. 62 °C	30 sec
Elongation	72 °C	30 sec
Finale Elongation	72 °C	10 min
} 30-mal		

3.2.7 Fusion von PCR-Fragmenten

Mittels einer mehrstufigen PCR können mehrere DNA Fragmente miteinander fusioniert werden. Hierzu werden die einzelnen Fragmente in einem ersten Schritt mittels spezifischer Primer amplifiziert. Diese Primer enthalten je am 5' Ende eine zur fusionierenden DNA homologe Überhangsequenz, die somit gleichzeitig an das gewünschte Fragment angehängt wird. Die aufgereinigten Fragmente werden in einem zweiten Schritt zusammen in einem Reaktionsansatz eingesetzt. Durch die homologen Bereiche binden diese aneinander und werden von der eingesetzten Polymerase als ein Produkt amplifiziert.

Dieses Verfahren wurde genutzt, um Zielsequenzen der Archaeen für die qPCR zu fusionieren und später in *E. coli* DH5 α hpaZ1 zu klonieren (siehe Kapitel 3.2.12).

3.2.8 Quantifizierung der Zellzahl mittels qPCR

Bei der Real Time PCR oder qPCR (quantitative PCR) wird DNA nicht nur vervielfältigt, sondern darüber hinaus auch quantitativ bestimmt. Im Reaktionsgemisch ist neben den üblichen Komponenten für eine PCR ein Farbstoff enthalten, der fluoresziert, sobald er mit dsDNA interkaliert. Nach jedem Zyklus der qPCR wird die Fluoreszenzintensität gemessen, welche proportional zur DNA-Menge ansteigt. Über einen Standard, welcher als Verdünnungsreihe mit bekannter DNA-Konzentration im Triplikate mitläuft, kann nun die DNA Konzentration der Proben bestimmt werden. Im Verlauf einer qPCR-Reaktion existieren wie in einer Standard-PCR zwei Phasen, die exponentielle und die Plateau Phase. Zu Beginn der exponentiellen Phase verläuft das Fluoreszenzsignal im Hintergrund, bis die DNA-Konzentration und damit die Fluoreszenz den Schwellenwert erreicht haben, an dem die Fluoreszenz klar vom Hintergrundsignal zu unterscheiden ist. Dieser Punkt ist der C_q -Wert (quantification cycle), dessen Wert abhängig von der eingesetzten DNA Menge ist. Im Folgenden wird die DNA-Menge mit jedem Zyklus verdoppelt, bis eine der Komponenten des PCR-Ansatzes limitierend wird und so die Plateau Phase einleitet. Eine perfekte Verdopplung der DNA pro Lauf würde sich mit der Formel

$$2^n = \text{Verdünnungsfaktor}$$

ausdrücken, wobei n die Zyklenanzahl zwischen den Fluoreszenzschwellenwerten ist. Das Bestimmtheitsmaß R^2 repräsentiert den Grad der Korrelation der experimentellen Daten mit der Regressionslinie. Die Amplifikationseffizienz hingegen berechnet sich aus der Formel:

$$E = 10^{-1/\text{Steigung}}$$

Ein qualitativ hochwertiger Lauf wird über eine hohe Amplifikationseffizienz (90-105 %), eine lineare Standardkurve ($R^2 > 0,980$ oder $r > 1-0,990$) und einer Konsistenz innerhalb der Wiederholungen charakterisiert. Um Fehlbindungen der Primer und damit ungewollte PCR-Fragmente ausschließen zu können, wird im Anschluss an jede qPCR eine Schmelzkurve, sowie ein Lauf über ein Agarosegel angeschlossen.

Zur Erstellung der Kalibrierkurve wurde eine 1:50 Verdünnung einer *E. coli* DH5 α hpaZ1 Übernachtskultur in einer Neubauer improved Zählkammer (Tiefe 0,01 mm, Fläche 0,0025 mm², Lauda-Königshofen, Marienfeld) mit einer 630-fachen Vergrößerung über ein Leica DM750 Lichtmikroskop ausgezählt. Es wurden insgesamt 21 Gruppenquadrate aus zwei

Ansätzen in der Zählkammer gezählt und daraus der Mittelwert gebildet. Aus der Kammertiefe und deren Fläche kann man so die Zellzahl pro ml berechnen.

Die qPCR Reaktionen wurden in einem CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories GmbH, München) durchgeführt, wobei die optimale Annealingtemperatur über einen Temperaturgradienten ermittelt wurde. Die Generierung der Standardkurven erfolgte im Triplikate mit Verdünnungsreihen aus *E. coli* DH5alphaZ1 Zellen mit entsprechenden 23S rDNA Zielsequenzen der *Thermoplasmatales* bzw. der ARMAN (siehe Kapitel 3.2.12). Proben der Anreicherungskulturen wurden über technische Duplikate aus biologischen Triplikaten quantifiziert. Die Zusammensetzung eines Standardansatzes und ein Laufprotokoll ist Tabelle 3-10 bzw. Tabelle 3-11 zu entnehmen.

Tab. 3-10: Standardansatz für eine qPCR.

Substanz	Menge (20 µl Ansatz)
SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix	10,0 µl
Primer forward (4 µM)	7,5 µl
Primer reverse (4 µM)	7,5 µl
ddH ₂ O	4 µl
Template DNA	1 µl

Tab. 3-11: Standardprogramm für die qPCR mit dem CFX96™ Real-Time PCR Detection System.

Schritt	Temperatur	Zeit
Einleitende Denaturierung	95 °C	7 min
Denaturierung	95 °C	10 sec
Annealing	53 °C	15 sec
Elongation	65 °C	30 sec
Quantifizierung		
Schmelzkurve	60 °C - 98 °C	0,1 °C/sec

} 32-mal

3.2.9 Agarose-Gelelektrophorese

Für die Auftrennung von amplifizierten PCR-Produkten nach ihrer Größe wird die Agarose-Gelelektrophorese genutzt. Durch das Anlegen eines elektrischen Feldes wandert die negativ geladene DNA abhängig von ihrer Größe schneller oder langsamer durch die Matrix des Agarosegels Richtung Anode. Midori Green Advance (Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf), welches grünes Licht emittiert (Anregungsmaximum 490 nm, Emission 530 nm), wenn es an Nukleinsäuren bindet, diente als Farbstoff zur Sichtbarmachung der DNA.

Für die Auswertung einer Standard-PCR wurde stets ein 1 %-iges Agarose Gel verwendet (Tab. 3-12), wohingegen für die Analyse der qPCR-Ergebnisse 2 %-ige Gele Verwendung fanden. Hierzu wurde die entsprechende Menge Agarose in TAE Puffer aufgekocht, mit Midori Green als DNA bindenden Farbstoff versetzt und in einen Gelschlitten gegossen. Das Einsetzen eines Kamms ermöglichte die Bildung von Taschen für die Proben-Zugabe. Das auspolymerisierte Gel wurde in eine Elektrophoresekammer (PerfectBlue™ Mini S, PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen) mit TAE-Puffer gelegt und die amplifizierte DNA, wenn nötig, zusammen mit dem DNA Gel Loading Dye (6x) (Thermo Fisher Scientific, Schwerte) in die Taschen des Gels pipettiert. Das Anlegen einer konstanten Spannung von 120 V (PowerPac™ HC, Bio-Rad Laboratories GmbH, München) bewirkte eine Migration der DNA Richtung Anode. Als Größenstandard diente der GeneRuler 1 kb DNA Ladder (0,5 µg/µl) (Thermo Fisher Scientific, Schwerte), bzw. der GeneRuler 50 bp DNA Ladder (0,5 µg/µl) (Thermo Fisher Scientific, Schwerte) für die qPCR-Ergebnisse.

Analytische Gele wurden über einen ChemiDoc™ XRS+ (Bio-Rad Laboratories GmbH, München) und der zugehörigen Software Image Lab 5.1 (Bio-Rad Laboratories GmbH, München) ausgewertet.

Tab. 3-12: Zusammensetzung eines 1 %-igen Agarosegels.

Substanz		Menge
TAE-Puffer		60 ml
Tris	4,48 g/l	
Eisessig	1,14 ml/l	
EDTA (0,5 M)	2,00 ml/l	
Agarose		0,6 g
Midori Green Advance (0,2 %)		6 µl

3.2.10 CARD-FISH (Catalyzed reporter deposition fluorescence *in situ* hybridisation)

Die Catalyzed reporter deposition fluorescence *in situ* hybridization (CARD-FISH) ist eine Methode, um Zellen spezifisch anzufärben. Dabei werden rRNA-bindende DNA-Sonden in fixierte Zellen eingebracht, an die später ein fluoreszierender Farbstoff gekoppelt wird. So ist beispielsweise eine optische Unterscheidung der Arten innerhalb einer Mischkultur möglich. Im Gegensatz zur normalen FISH, bei der die Farbstoffe direkt an die entsprechenden Sonden gebunden sind, werden bei der CARD-FISH Tyramid-haltige Farbstoffe über eine kovalente Bindung an zu den Sonden benachbarte Tyrosine gebunden. Das 5'-Ende der CARD-FISH Sonden ist an eine HRP (horseradish peroxidase) gekoppelt. Die Zugabe von H₂O₂ bewirkt eine Radikalbildung der Tyramid-haltigen Farbstoffe, welche von der HRP reduziert und so an Phenolreste benachbarter Tyrosine gebunden werden. Da mehrere Farbstoffmoleküle von einem HRP-Molekül und damit von einer Sonde umgesetzt werden können, wird das entstehende Fluoreszenzsignal um ein Vielfaches verstärkt. Somit können vor allem kleine Zellen oder Zellen mit geringer Aktivität, und damit geringem Ribosomengehalt, sichtbar gemacht werden.

Fixierung der Proben

Da rRNA nach dem Zelltod sehr schnell abgebaut wird, mussten die Proben vor dem Anfärben fixiert werden. Dazu wurden 200 µl einer Kultur für 2 min bei 16000 g abzentrifugiert und das Pellet mit 1 ml 4 %-igem Formaldehyd in entsprechendem Medium für 1 Stunde bei 4 °C fixiert. Es folgten zwei Waschschrte mit je 1 ml PBS-Lösung, bevor die fixierten Zellen in 200 µl eines 50:50 Gemisches aus PBS/EtOH (100 %) aufgenommen und bei -20 °C bis zur Färbung gelagert wurden.

Durchführung

Je 10 µl einer Probe wurden auf eine Vertiefung eines PTFE-beschichteten Objektträgers (Diagnostic Microscope Slide, 8 well, Thermo Fisher Scientific, Schwerte) getropft und bei 37 °C getrocknet. Für eine zusätzliche mechanische Festigung der Zellen am Objektträger dienten einige Tropfen 0,1 %-iger Low melt Agarose. Auf eine Trocknung bei 37 °C folgte die Dehydrierung der Proben in aufsteigender Ethanolkonzentration (50 %, 80 %, 100 %) für jeweils 3 min. Eine 10-minütige Inkubation der Objektträger in 0,1 M HCl sollte die Zellen permeabilisieren und potentielle, zelleigene endogene Peroxidasen inhibieren. Nach einem kurzen Eintauchen der Objektträger in ddH₂O und anschließender Trocknung, konnten die Proben hybridisiert werden. Dazu wurden je ca. 15 µl Hybridisierungslösung (0,5 µl

HRP-Sonde (50 ng/ μ l) und 74,5 μ l Hybridisierungspuffer) (Tab. 3-13) pro Vertiefung auf dem Objektträger für 1,5-3 Stunden bei 46 °C inkubiert. Die Lagerung in einer mit angefeuchteten Kimtech-Tüchern (Roth, Karlsruhe) versehenen Kammer, welche mit 2 ml einer des Hybridisierungspuffers entsprechenden Formamidkonzentration versehen waren, verhinderte das Abtrocknen der Lösung während der Hybridisierung. Es folgte das Waschen der Objektträger in entsprechendem auf 48 °C vorgewärmten Waschpuffer (Tab. 3-14). Nach einem Eintauchen in die erste Waschpufferlösung wurden die Objektträger für 15 Minuten bei 48 °C in der zweiten Waschpufferlösung inkubiert. Auf einen weiteren 15-minütigen Waschschrift in SSC-Puffer (Tab. 3-15) folgte die Amplifizierung. Das Austrocknen der Objektträger war in diesem Schritt unbedingt zu vermeiden, weshalb die Objektträger um die Vertiefungen herum nur leicht mit einem Kimtech-Tuch abgetrocknet und die Amplifizierungslösung unverzüglich aufgetropft wurde. Die Amplifizierungslösung setzte sich aus 500 μ l Amplifizierungspuffer (Tab. 3-16), 0,5 ml Alexa-Tyramid und 5 μ l verdünntem H_2O_2 (1 ml H_2O_2 (37 %) in 199 μ l PBS) zusammen. Da H_2O_2 sehr reaktiv ist, wurde die Amplifizierungslösung stets frisch angesetzt. Auf eine 20-minütige Inkubation in einer feuchten Kammer bei 37 °C, folgte ein zweimaliges Waschen der Objektträger für 15 Minuten in SSC-Puffer. Nach einem kurzen Eintauchen in ddH₂O wurde ein neuer Hybridisierungs- und Amplifikationszyklus ab dem Schritt der Inkubation in 0,1 M HCl begonnen. Eine abschließende Gegenfärbung mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol) (1 μ l/ml), welcher an jegliche DNA bindet, diente der Kontrolle. Die DAPI-Lösung wurde 5 Minuten auf dem Objektträger inkubiert, dieser zweimal für 1 Minute in ddH₂O gewaschen und kurz in 96 %-iges EtOH getaucht. Um ein vorzeitiges Ausbleichen der Farbstoffe zu verhindern und um die Deckgläser auf dem Objektträger zu fixieren, wurden nach dem Trocknen der Proben einige Tropfen Einbettpuffer (Tab. 3-17) pro Vertiefung aufgetragen. Die Lagerung der Objektträger erfolgte bei -20 °C.

Tab. 3-13: Zusammensetzung der verwendeten Hybridisierungspuffer.

Substanz	30 % FA	20 % FA
5 M NaCl	3,60 ml	3,60 ml
1 M TrisHCl (pH 8,0)	0,40 ml	0,40 ml
dd H ₂ O	8,00 ml	10,00 ml
Dextran-Sulfat	2,00 g	2,00 g
20 % SDS	0,02 ml	0,02 ml
10 % Blocking Reagent# (Roche)	2,00 ml	2,00 ml
Formamid (FA)	6,00 ml	4,00 ml

#Blocking Reagent wurde in Maleinsäure-Puffer gelöst (100 mM Maleinsäure, 150 mM NaCl, pH 7,5). Um das Dextran-Sulfat zu lösen, musste die Lösung auf 60 °C erhitzt werden.

Tab. 3-14: Zusammensetzung der verwendeten Waschpuffer.

Substanz	30 % FA	20 % FA
5 M NaCl	2,04 ml	4,30 ml
1 M TrisHCl (pH 8,0)	2,00 ml	2,00 ml
0,5 M EDTA (pH 8,0)	1,00 ml	1,00 ml
20 % SDS	0,05 ml	0,05 ml
ddH ₂ O	95,00 ml	93,00 ml

SDS wurde am Ende zugegeben.

Tab. 3-15: Zusammensetzung des SSC Puffers (20×).

Substanz	Menge
NaCl	175,2 g
Tri-Na-Citrat-Dihydrat	88,2 g
ddH ₂ O	ad 1 l

Der pH-Wert wurde mittels 7 N HCl auf 6,0 eingestellt.

Tab. 3-16: Zusammensetzung des Amplifikationspuffers.

Substanz	Menge
1×PBS	8 ml
5 M NaCl	16 ml
Dextransulfat	4 g
10 % Blocking Reagent# (Roche)	0,4 ml
ddH ₂ O	ad 40 ml

#Blocking Reagent wurde in Maleinsäure-Puffer gelöst (100 mM Maleinsäure, 150 mM NaCl, pH 7,5). Um das Dextran-Sulfat zu lösen, musste die Lösung auf 60 °C erhitzt werden.

Tab. 3-17: Zusammensetzung des Einbettpuffers.

Substanz	Menge
Citiflour	11 ml
Vectashield	2 ml
1×PBS	1 ml

3.2.11 CARD-FISH der Fließzellen

Da die Fließzellen ein abgeschlossenes System darstellen, musste das CARD-FISH Protokoll angepasst werden. Im Rahmen einer Kooperationsarbeit entwickelte Eva Krolitzki in ihrer Diplomarbeit unter der Leitung von Herrn Prof. Hubbuch vom Lehrstuhl für Molekulare Aufarbeitung von Biomolekülen, Institut für Bio- und Lebensmitteltechnik am KIT, ein CARD-FISH Protokoll für die Anwendung an einem Pipettierroboter Freedom Evo (Tecan Trading AG, Switzerland). Hierfür wurde eine Zufluss- und Ausfluss-Konstruktion aus PDMS als Verbindung für den Pipettierroboter mit den Fließzellen hergestellt. Zusätzlich wurde eine Halterung von der Firma Sculpteo (Frankreich) über 3D-Druck gefertigt, in welche bis zu drei Fließzellen gleichzeitig eingespannt und mithilfe von Kapillaren mit den Zugangskonstruktionen verbunden werden können. Mittels dieser Konstruktion war es möglich, bis zu drei Fließzellen parallel über CARD-FISH anzufärben (Abb. 3-1).

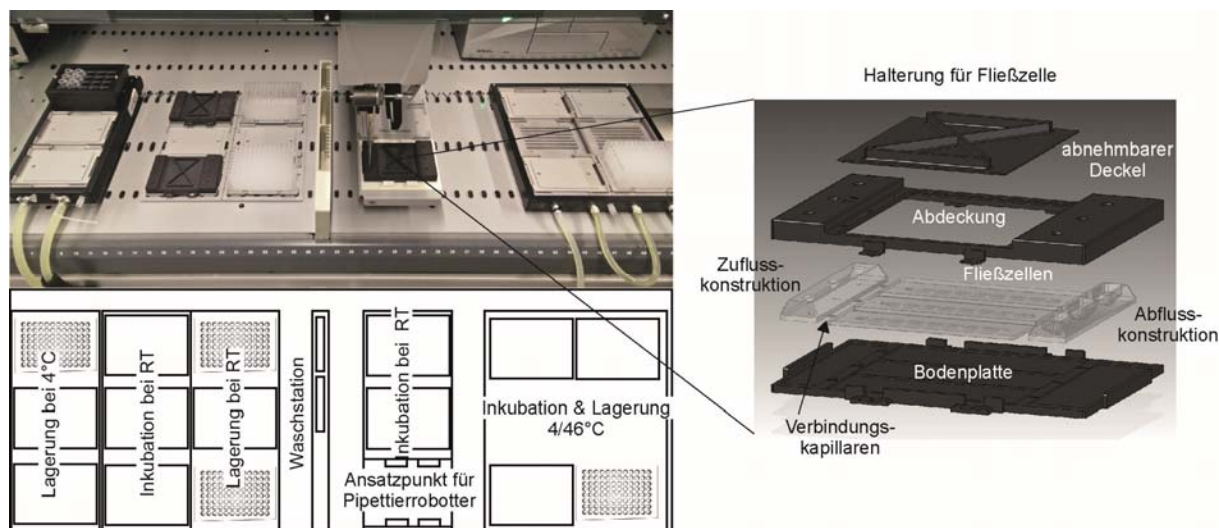


Abb. 3-1: Übersicht über die Halterungen für die Fließzellen für die automatisierte CARD-FISH und die Aufteilung der Stationen im Pipettierroboter. (Abbildung nach S. Hansen).

Die Fixierung erfolgte ähnlich der Kultivierung über Spritzenpumpen. Es wurde eine 4 %-ige Formaldehydlösung in entsprechendem Medium angesetzt und für 2 Stunden mit einer Flussrate von 10 $\mu\text{l}/\text{min}$ durchspült. Anschließend wurden die Fließzellen für 10 min mit PBS Puffer durchspült, wobei hier die Flussrate an die des Pipettierroboters angepasst wurde und 50 $\mu\text{l}/\text{min}$ betrug. Nachfolgend wurden die Fließzellen mit der Halterung für den Roboter verbunden.

Nachfolgende Schritte wurden über den Pipettierroboter getätigt (Tab. 3-18) und entsprachen den Schritten der normalen CARD-FISH (Kapitel 3.2.10)

Tab. 3-18: CARD-FISH Protokoll der Fließzellen über einen Pipettierroboter.

Arbeitsschritt	Reagenz	Inkubationszeit [min]
1. Permeabilisierung/Inhibierung endogener Peroxidasen	360 μl 0,1 M HCl	10
2. Waschen	360 μl ddH ₂ O	Durchfluss
3. Hybridisierung	220 μl Hybridisierungspuffer	90
4. Waschen	540 μl Waschpuffer	15
	360 μl SSC	15
	360 μl ddH ₂ O	Durchfluss
5. Amplifizierung	220 μl Amplifikationspuffer	20
6. Waschen	540 μl SSC	30
	540 μl H ₂ O	Durchfluss

Beginn zweiter Durchlauf für Doppelfärbung mit zweiter Sonde bei Schritt 1		
7. Gegenfärbung	360 µl DAPI-Lösung	5
8. Waschen	360 µl ddH ₂ O	Durchfluss
9. Einbetten	220 µl Einbettpuffer Citifluor AF3 (Citifluor Limited, UK)	Durchfluss

3.2.12 Klonierung

Die Quantifizierung über die Lichtmikroskopie der in Ermangelung einer Zellwand pleomorphen und mit 0,2 µm–5 µm (Durchmesser) recht kleinen *Thermoplasmales* gestaltet sich als sehr schwierig, was ebenso für die noch kleineren, als Nanoorganismen beschriebenen ARMAN gilt. Eine Unterscheidung der Arten, bzw. eine repräsentative Quantifizierung ist in einer solchen Mischkultur über die Lichtmikroskopie nicht möglich. Die Klonierung speziesspezifischer Markersequenzen der drei Zielorganismen in das Genom von *E. coli* DH5alphaZ1 ermöglichte das Zellenzählen für die Generierung einer Standardkurve.

Es wurde wie folgt vorgegangen:

Fusionierung der Markersequenzen:

Hierfür wurden die Markersequenzen aus den Zielorganismen amplifiziert und wie in Kapitel 3.2.7 beschrieben fusioniert (Primersequenzen siehe Tab. 2-1).

Klonierung mittels Restriktion und Ligation:

Zusätzliche Überhangsequenzen mit eingefügter *Bam*HI Schnittstelle am 5' Ende und *Sac*I Schnittstelle am 3' Ende ermöglichte die Klonierung mittels Restriktion und Ligation in das Plasmid pAH95 (Haldimann and Wanner, 2001). Um komplementäre Enden zu generieren werden bei dieser Methode sowohl das Plasmid, als auch die Zielsequenz an einer entsprechenden Restriktionsschnittstelle geschnitten, an denen sich Plasmid und DNA-Fragment anlagern können. Für den Restriktionsansatz wurden die Restriktionsenzyme *Bam*HI HF und *Sac*I HF (New England Biolabs, Frankfurt a. M.) nach Herstellersprotokoll verwendet (Tab. 3-19).

Tab. 3-19: Restriktionsansatz.

Substanz	Menge
Cut Smart Puffer (10-fach)	5 µl
<i>Bam</i> HI HF	1 µl
<i>Sac</i> I HF	1 µl
Vektor bzw. gewünschtes DNA-Fragment	10 µl (107 ng/µl) bzw. 20 µl (93 ng/µl)
ddH ₂ O	33 µl (Vectoransatz) bzw. 23 µl (DNA-Fragment-Ansatz)

Der Ansatz wurde 20 min bei 37 °C inkubiert. Nach erfolgter Trennung der geschnittenen DNA-Fragmente über ein Agarose-Gel und anschließender Aufreinigung der DNA, wurden in einer nachfolgenden Ligation das Plasmid und die Ziel-DNA mithilfe einer T4 DNA Ligase (New England BioLabs GmbH, Frankfurt a.M.) miteinander ligiert (Tab. 3-20).

Tab. 3-20: Ligationsansatz.

Substanz	Menge
Ligasepuffer (10-fach)	2 µl
T4 DNA Ligase	1 µl
Gewünschter Vektor	4 µl (äquimolar zu DNA-Fragment)
Zu klonierendes DNA-Fragment	1 µl (äquimolar zu Vektor)
ddH ₂ O	12 µl

Der Ligationsansatz wurde für 1 h bei RT inkubiert und anschließend dialysiert. Das Dialysieren dient der Reinigung der Ligationsansätze von verbliebenen Salzen, welche die nachfolgende Elektroporation stören würden. Hierzu wurden 10 µl des entsprechenden Ansatzes auf eine auf ddH₂O schwimmende Filtermembran (Millipore VSWP, 0,025 µm, Millipore, Billerica, USA) pipettiert. Der Filter ist für die im Ansatz zurückgebliebenen Salze durchlässig, welche aufgrund der unterschiedlichen osmotischen Verhältnisse durch die Membran in das ddH₂O diffundieren.

3.2.13 Transformation in kompetente Zellen

Die Transformation des Ligationsansatzes erfolgte mithilfe elektrokompetenter Zellen. Hierfür wurde eine Übernachtskultur des entsprechenden *E. coli* Stammes am Morgen frisch angeimpft und bis zu einer OD von 0,6 inkubiert. Um weiteres Wachstum zu inhibieren, wurden die Zellen sodann auf Eis gelagert. 5 ml dieser Kultur wurden für 5 Minuten bei 6000 g und 4 °C abzentrifugiert und zweimal mit sterilem, 4 °C kaltem ddH₂O gewaschen, um jegliche Salzreste des Mediums zu entfernen. Die Zellen wurden in 200 µl ddH₂O aufgenommen, wovon sofort 120 µl zusammen mit 5 µl Helferplasmid bzw. Ligationsansatz in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette pipettiert wurde. Bei der Elektroporation wird die Cytoplasmamembran der Zellen über einen elektrischen Impuls perforiert und so für Fremd-DNA zugänglich gemacht. Der Stromimpuls erfolgte mittels des *E. coli*-Pulsers (Bio-Rad, München) bei 1,8 kV für 5 s. Die unmittelbar folgende Inkubation bei 37 °C für eine Stunde in 600 µl SOC sollte eine Regeneration der Zellen ermöglichen. Das nachfolgende Ausplattieren der Zellen auf LB-Agar mit entsprechendem Antibiotikum gewährleistete eine Selektion auf positive Klone.

3.2.14 CRIM-Klonierung

Mithilfe von sogenannten CRIM (conditional replication, integration and modular) Plasmiden können DNA-Sequenzen reversibel in das Genom von *E. coli* integriert werden (Haldimann und Wanner, 2001). Die Plasmide enthalten *E. coli* eigene Phagenbindestellen, wodurch sie mithilfe einer durch ein Helferplasmid vermittelten Integrase in die entsprechende bakterielle Bindestelle ins *E. coli*-Genom integriert werden können. Die Synthese der Integrase wird erst durch einen Temperaturanstieg von 30 °C auf 37 °C induziert. Da ebenso die Replikation des Helferplasmids temperatursensitiv ist, wird dieses bei einem Temperaturanstieg auf 42 °C zeitgleich von den Zellen entfernt. Zusätzlich enthalten die Plasmide einen R6K-ori, wodurch sie von Standard *E. coli*-Zellen nicht repliziert werden können und so komplett in das Genom aufgenommen werden.

Hier wurde das Plasmid pAH95 mit entsprechendem Helferplasmid pAH121 für die Klonierung eingesetzt. Zunächst wurde das Helferplasmid mittels Elektroporation in *E. coli* DH5alphaZ1 transformiert und zur Selektion bei 30 °C auf LB-Agar Platten mit 100 µg/ml Ampicillin inkubiert. Nach erfolgter Co-Transformation des hier verwendeten pAH95,

welches zusätzlich eine Kanamycin-Resistenz enthielt, war eine der Elektroporation nachfolgende, halbstündige Inkubation auf 42 °C nötig, um das temperatursensitive Helferplasmid aus den Zellen zu schleusen. Mittels Inkubation auf LB-Platten mit 40 µg/ml Kanamycin bei 37 °C konnte auf positive Klone selektioniert werden. Entgegen den Angaben der Originalpublikation von Haldiman und Wanner wurde die Kanamycin-Konzentration zur Selektion auf single-copy Kolonien deutlich erhöht, da so die Ausbeute an positiven Klonen gesteigert werden kann. Gleichzeitig dürfen die auf Kanamycin wachsenden Klone nicht mehr auf Ampicillin-haltigen Platten wachsen, wenn das Ausschleusen des Helferplasmids erfolgreich war.

3.3 Sequenzierungsmethoden

3.3.1 DNA-Sequenzierung, Alignments und Stammbäume

Die Sequenzierung amplifizierter DNA-Abschnitte zur Prüfung ihrer Korrektheit erfolgte bei der Firma Eurofins Genomics GmbH (Ebersberg) mithilfe des Mix2Seq Kits. Hierfür wurde das entsprechende PCR-Produkt nach den Vorgaben der Firma vorbereitet und von dieser per Cycle Sequencing Technology sequenziert. Das Ergebnis wurde über das Programm Geneious 5.6.7 (Biomatters) mit der Originalsequenz abgeglichen oder im Fall von 16S rRNA Gensequenzen mit der Datenbank des National Center for Biotechnology Information (NCBI) (Altschul *et al.*, 1990) abgeglichen.

Die Software Geneious wurde ebenfalls für die Erstellung von Alignments und zugehöriger Stammbäume genutzt.

3.3.2 454 Sequenzierung

Bei der 454 Sequenzierung handelt es sich um eine Next Generation Sequencing Methode. Hierbei wird eine Emulsions-PCR gefolgt von einer Pyrosequenzierung eingesetzt, um die Sequenzabfolge eines DNA-Abschnittes zu bestimmen. In einem ersten Schritt wird an jedes Ende der zu analysierenden DNA ein Adapter gehängt. Der Adapter dient später dazu, die DNA während der Emulsions-PCR an einen Bead zu koppeln. Die zu analysierende DNA, die Beads, ebenso wie alle erforderlichen Substanzen für eine PCR werden in ein Öl-Wasser-Gemisch gegeben. Im Idealfall enthält nach anschließender Durchmischung jeder ölmhüllte

Wassertropfen einen Bead mit einem DNA-Abschnitt. Dieser wird über den Adapter an den Bead gekoppelt und über einen zum zweiten Adapter komplementären Primer amplifiziert. Für die nachfolgende Pyrosequenzierung werden die Beads in einer Pico-Titer-Platte aufgeteilt, sodass in jeder Vertiefung ein Bead zu finden ist. Für die eigentliche Sequenzierung werden nun vier verschiedene Enzyme eingesetzt: Zuerst wird der zu sequenzierende ssDNA-Abschnitt über eine Polymerase und zugesetzte dNTPs verlängert. Eine ATP Sulfurylase setzt das bei der Sequenzverlängerung freigewordene Pyrophosphat zusammen mit Adenosin-5'-Phosphosulfat zu ATP und Sulfat um. Durch das entstandene ATP kann eine zugesetzte Luciferase Luciferin oxidieren, wodurch Energie in Form von Licht freigesetzt wird. Die Intensität dieses Lichtblitzes ist proportional zum entstandenen ATP, wodurch Rückschlüsse auf die Anzahl der eingebauten dNTPs gezogen werden können. Am Schluss werden die verbliebenen dNTPs von einer Apyrase abgebaut und neue dNTPs können zugesetzt werden.

Die 454 Sequenzierung wurde in dieser Arbeit genutzt, um die phylogenetische Zusammensetzung der Ko-Kulturen nach einem bestimmten Zeitraum der Kultivierung zu erfassen. Hierfür wurde aus den Ko-Kulturen DNA mithilfe des innuSPEED Soil DNA Kit von Analytik Jena (Kapitel 3.2.1) aufgereinigt. Die Amplifikation der DNA erfolgte über spezifische Primer, welche zusätzlich die Sequenzen für die Adaptern enthielten, und eine iProof PCR (Kapitel 3.2.6) (Annealing Temperaturen: Bakteria: 56 °C, Archaea: 52 °C), und wurde anschließend wie in Kapitel 3.2.3 beschrieben aufgereinigt. Die Sequenzierung fand über die Firma IMG^M Laboratories GmbH (Martinsried) auf einem FLX-Junior (Roche) statt.

3.3.3 Illumina Sequenzierung

Bei dieser Methode wird die isolierte DNA zuerst in kurze Fragmente geschnitten, welche wiederum in einer sogenannten reduced cycle amplification an beiden Enden mit Adaptern versetzt werden. Diese Adaptern beinhalten jeweils eine Primerbindestelle für die spätere Amplifikation, eine Index-Region für die spätere Identifizierung und Zuordnung der Sequenzen zu den einzelnen Proben und eine Region, welche komplementär zu den an einen Glasträger gebundenen Oligonukleotiden ist, an welche die zu sequenzierenden DNA-Stränge binden und so in Position gehalten werden. Über eine Brückenamplifikation werden die Einzelstränge der Nukleinsäuren vervielfältigt, wodurch Bereiche entstehen, welche eine große Anzahl an Kopien der gleichen Sequenz aufweisen. Für die eigentliche Sequenzierung

bindet ein Primer an den Adapter und über eine Polymerase wird der DNA-Strang amplifiziert. Bei der sogenannten Sequencing by synthesis Methode werden ausschließlich Nukleotide eingesetzt, welche zu einem Kettenabbruch führen. Das heißt, pro Zyklus kann ausschließlich ein fluoreszenzmarkiertes Nukleotid, welches komplementär zum jeweiligen Nukleotid des DNA-Stranges ist, binden. Die nicht gebundenen Nukleotide werden gewaschen und das Fluoreszenzsignal wird detektiert. Im Anschluss werden das Kettenabbruchsignal und der Fluoreszenzfarbstoff abgespalten und ein neuer Zyklus kann beginnen. Die Anzahl der durchlaufenen Zyklen gibt hier die Länge der entstandenen reads vor.

Die Whole Genome Shotgun Sequenzierung der isolierten DNA und RNA der Mischkulturen für die Erstellung des Metagenoms bzw. Metatranskriptoms erfolgte über eine Illumina Sequenzierung am KIT Campus Nord am Institut für Toxikologie und Genetik. Hierfür wurde ein Illumina HiSeq 1500 Sequencer benutzt. Die Sequenzierung der DNA erfolgte mit dem TruSeq DNA Kit von Illumina. Es wurde über eine high-throughput Flow Cell Lane nach der Illumina SBS Technologie mit 2×50 bp paired-end sequenziert.

Die Sequenzierung der RNA erfolgte mit dem Kit TruSeq RNA v2 von Illumina und es wurde mittels 2×100 bp paired-end sequenziert.

3.4 Bioinformatische Analysen

3.4.1 Phylogenetische Analyse der Ko-Kulturen

Die phylogenetische Analyse der 454 Sequenzierung der 16S rDNA der Ko-Kulturen erfolgte durch Dr. Katharina Geiger vom Institut für Angewandte Biowissenschaften, Abteilung Angewandte Biologie des KIT (Geiger, 2016).

Hierfür wurde das Programm QIIME (quantitative insight into microbial ecology) (Caporaso *et al.*, 2010) genutzt.

Reads mit einer Sequenzlänge unterhalb 200 bp oder einem quality score unterhalb von 25 wurden verworfen. Die Generierung von OTUs (operational taxonomic units) der übrigen Sequenzen setzte eine 97 %-ige Sequenzübereinstimmung voraus. Über den RDP classifier wurde jedes OTU taxonomisch abgeglichen, wobei die neueste Version der Greengenes Datenbank gg_12_10 (http://greengenes.secondgenome.com/downloads/database/12_10)

und voreingestellte Optionen verwendet wurden (DeSantis *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2007; J. Gregory Caporaso *et al.*, 2010).

3.4.2 Analyse des Metagenoms und Metatranskriptoms

Die bioinformatische Auswertung der Metagenom- und Metatranskriptom-Daten wurde von Dr. Andreas Bremges und Philipp Münch unter der Leitung von Prof. Alice McHardy vom Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung in Braunschweig durchgeführt.

MCL-Analysen

Mittels OrthoMCL wurden nach dem Protokoll von Hacquard *et al.* (2016) Cluster orthologer Gene abgeleitet, (v. 2.0, percent-match cutoff festgesetzt auf 50, E-Wert-exponent cutoff von -15, minimale Länge von 10, max percent stop festgesetzt auf 20 und granularity von 1.5). Für die Annotation wurden für jede KEGG orthologous group (KO) der Datenbank HMM models mit Hilfe des HMMER toolkits (v. 3.1b2) generiert. Die HMM models dienen der Suche aller vorhergesagten ORFs (open reading frames) mittels hmmsearch (v. 3.1b2, E-Wert cut-off von 0.001), wobei die Hits mit den höchsten vorhergesagten Werten für die Annotation ausgewählt wurden. Weiterhin wurde eine multiple testing correction basierend auf FDR mit einem gesetzten alpha von 0.5 durchgeführt.

Metagenom assembly und binning

Alle Metagenom-Reads der beiden Replikate S1 und S2 wurden gemeinsam mittels Ray Meta (v 3.2.1, Boisvert *et al.*, 2012) mit einer k-mer Größe von 31 assembliert. Assembler und k-mer Größe wurden empirisch ausgewählt, um die Kontiguität (die Länge der Contig) und Inklusivität (den Prozentsatz der beinhalteten Reads) des Metagenomassemblies zu maximieren. Als Proxy für die Kontiguität wurden N50 Werte verglichen, die von QUAST berechnet wurden (v 3.1, Gurevich *et al.*, 2013). Um die Inklusivität zu bestimmen, wurden alle Metagenomreads gegen die mit Bowtie 2 (v 2.2.4, Langmead und Salzberg, 2013) assemblierten Contigs aligned. Die Mapping-Statistiken wurden mittels SAMtools (v 1.1, Li *et al.*, 2009) berechnet.

Anschließend wurden aus dem Metagenomassemblies die Genom-Bins mittels MetaBAT (v 0.23.1, Kang *et al.*, 2015) im „very specific“ Modus erstellt. MetaBAT ist ein autonomes

Binning tool, das die Nucleotidzusammensetzung – genauer Tetranucleotid-Frequenzen – und die differentielle Coverage-Information pro Probe nutzt, um Contigs in Genom-Bins zu sortieren. Nach manueller Prüfung der automatisch generierten vier Genom-Bins, wurden zwei fragmentierte Genom-Bins manuell zusammengeführt, wodurch am Ende drei fertige Genom-Bins erhalten wurden.

Abschließend wurde für jedes Bin die Vollständigkeit und Kontamination mittels CheckM (v 1.0.4, Parks *et al.*, 2015) bestimmt und jedes Contig mit taxator-tk (v 1.2.1, Droege *et al.*, 2015) taxonomisch klassifiziert.

Die taxonomische Abundanz beider Metagenom-Replikate wurden über Krona (Ondov *et al.*, 2011) visualisiert, wobei jedes Contig mit der Anzahl der darin enthaltenen Reads gewichtet wurde.

Funktionelle Annotation und KEGG Analysen

Die Genom-Bins wurden mit Prokka (v. 1.11, Seemann, 2014) annotiert, welches RNAmmer (v 1.2, Lagesen *et al.*, 2007) und Prodigal (v. 2.6.0, Hyatt *et al.*, 2010) nutzt, um ribosomale RNA Gene oder proteincodierende Gene vorherzusagen. Die Anzahl der Metagenom- und Metatranskriptomreads innerhalb der Gene wurde mittels BEDTools (v 2.22.0, Quinlan und Hall, 2010) bestimmt. Außerdem wurden hierüber die Reads pro Kilobase (RPK)-Werte bestimmt. Diese Informationen wurden desweiteren für die Bestimmung der Anzahl der 23S rRNA Genkopienanzahl genutzt. Weiterhin wurden die codierenden Sequenzen zusätzlich mit dem KEGG Automatic Annotation Server (v 2.0, Moriya *et al.*, 2007) annotiert, um orthologe Gene und die zugehörigen KEGG pathways zu ermitteln (r78, Kanehisa und Goto, 2000). Hierfür wurden die besten bi-direktionellen BLAST hits gegen 40 ausgewählte Organismen verglichen, um die häufigsten Stoffwechselwege abzudecken, wobei der Fokus auf Archaeen und verwandten Organismen lag (KEGG-eigene Abkürzungen der zum Vergleich herangezogenen Organismen: *neq, csy, mse, sai, iho, pto, tac, mac, msi, abi, hth, afo, pfr, mlu, mta, afe, acr, pde, gme, son, ppr, eco, aca, mer, fpl, nde, dap, dte, hya, rsp, dba, rfr, reu, pae, avn, acb, fbl, kcr, asc* und *tvo*).

Genomvergleich

Die Visualisierung des Vergleichs der analysierten Genome untereinander und mit den nächst verwandten Arten erfolgte mittels Circos Plots (Krzywinski *et al.*, 2009), für deren Erstellung Donut (unveröffentlicht; <https://github.com/hzi-bifo/Donut>) mit ausgewählten KEGG terms (Tab. A-5) genutzt wurde. Für die Detektion von ORFs in Genomen wurde prodigal v. 2.6.3 (Hyatt *et al.*, 2010) genutzt und für deren Annotation prokka v. 1.2 (Seemann, 2014). Hits für KEGG HMM wurden mit dem hmmsearch Kommando von HMMER (Eddy, 1998) abgeleitet, mit einem E-Wert von 0,0001. Die Ermittlung der Ähnlichkeiten von ORFs unterschiedlicher Genome erfolgte mit blastp des NCBI-blast Programmes 2.2.30 (Altschul *et al.*, 1990), mit einem E-Wert von 1e-100. Um die Gen-Dichte und Dichte hypothetischer Gene innerhalb eines sliding windows (Schiebefensterverfahren) von 10000 Nukleotiden zu ermitteln, wurde eine Kombination aus SAMtools (Li *et al.*, 2009) und BEDTools (Quinlan und Hall, 2010) genutzt.

3.5 Fluoreszenzmikroskopie

Im Gegensatz zur Lichtmikroskopie wird bei der Fluoreszenzmikroskopie das fluoreszente Präparat nicht von unten, sondern von seitlich eingestrahlt Licht beleuchtet. Dieses wird zunächst durch einen Anregungsfilter geleitet, der ausschließlich für Licht einer zum Fluoreszenzfarbstoff passenden Wellenlänge durchlässig ist, geleitet und dann über einen dichroitischen Strahlteiler auf die zu untersuchende Probe gelenkt. Bei der Absorption dieses Lichts geraten die Elektronen der Fluorochrome für wenige Nanosekunden auf ein höheres, instabiles Energieniveau. Bei der Rückkehr der Elektronen in ihren Ausgangszustand wird nun Licht einer etwas längeren Wellenlänge emittiert (Stokes Differenz, 20-50 nm). Dieses wird durch einen entsprechenden Emissionsfilter geleitet und so als Fluoreszenz sichtbar.

Die Überwachung des Wachstums der Ko-Kulturen erfolgte mittels CARD-FISH und anschließender Auswertung über ein Leica DM5500 B Mikroskop mit einer 12 V 100 W Halogenleuchte, betrieben mit einer Elektronikbox Leica CTR5500. Für die getrennte Betrachtung der unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffe wurden die Filter aus Tab. 3-21 gekoppelt mit einem HCX PL PLOUTAR 100×/1,30 OIL Objektiv verwendet. Bilder wurden mit der zugehörigen Kamera DFC 360 FX und der Software Leica LAS AF Lite gemacht.

Tab. 3-21: Übersicht über die verwendeten Objektivfilter.

Filterwürfel	Anregungsbereich	Anregungsfilter	dichroitischer Spiegel	Entstörfilter
+ A4	UV	BP 360/40	400	BP 470/40
+ L5	Blue	BP 480/40	505	BP 527/30
+ Y3	Green	BP 545/30	565	BP 610/75

Die Belichtungszeiten und Intensitäten mussten für die Färbung der *Thermoplasmatales* und der ARMAN-verwandten Organismen aufgrund der geringen Ribosomenanzahl der ARMAN unterschiedlich angepasst werden. Auch die Aufnahme von Einzelzellen und Zell-Aggregaten verlangte eine Anpassung der Belichtungszeit und Intensität, da die Zell-Aggregate meist extrem stark fluoreszierten. So waren die Belichtungszeiten von Einzelzellen (1000 ms) im Schnitt doppelt so lang, wie die für Zell-Aggregate (500 ms) und die Belichtung von einzelnen ARMAN-Zellen innerhalb von *Thermoplasmatales*-Aggregaten bis zu dreifach erhöht (1500 ms).

3.6 Konfokalmikroskopie

Der Vorteil der Konfokalmikroskopie liegt in der einzelnen Belichtung sehr kleiner Bereiche eines Präparates, im Gegensatz zur Epifluoreszenz, bei der stets die gesamte Probe beleuchtet wird. Somit können Fluoreszenzbilder unterschiedlicher Ebenen dickerer Proben gemacht werden, ohne dass eine zu hohe Hintergrundfluoreszenz stören würde. Erreicht wird dies durch die Nutzung eines gebündelten Lichtstrahls. Ausgehend von einem Laser wird das Licht durch eine „Lochblende“, ein sogenanntes Pinhole, gebündelt, wodurch nur in einem bestimmten Bereich Fluorophore angeregt werden. Die entstehende Hintergrundstrahlung wird durch die Nutzung eines zweiten Pinholes, welches auf das erste abgestimmt ist, vor dem Detektor rausgefiltert. Die Wellenlänge des Lichts wird durch die Wahl der eingesetzten Laser bestimmt. Zusätzlich kann das Laserlicht durch akusto-optische Kristalle (AOTF) sortiert werden.

Die Analyse der Biofilme in den Fließzellen wurde teilweise mit Hilfe eines Leica TSC SP5 Konfokalmikroskops durchgeführt. Das Mikroskop war ausgestattet mit einem PL FLUOTAR Objektiv 10.0×0.30 mit einer numerischen Apertur von 300. Genutztes Pinhole 70,7 µm. Die Emissionsbandbreite der Aufnahmen betrug 568 nm–678 nm und die

Scan-Geschwindigkeit 400 Hz. Es wurde ein Argon Laser (30 %) und ein DPSS (diode pumped solid state) 561 Laser eingesetzt. Genutzte AOTF waren: AOTF 561 (100 %), AOTF 488 (65 %), AOTF 351 (52 %) und AOTF 364 (51 %).

3.7 Bestimmung der Fe²⁺-Konzentration mittels Ferrozine-Test

Die Bestimmung der Fe³⁺-Reduktionsrate in den Kulturen wurde mithilfe des Ferrozine-Tests (Stookey, 1970) durchgeführt. Grundlage ist die photometrische Bestimmung des Fe²⁺-Gehalts einer gewünschten Lösung mittels einer Fe²⁺-konzentrationsabhängigen Blaufärbung, welche durch die Reaktion von Ferrozine (Dinatrium-4,4'-(3-(pyridin-2-yl)-1,2,4-triazin-5,6-diyl)bis(benzolsulfonat)) mit Fe²⁺ hervorgerufen wird. Unter Verwendung einer Kalibrierkurve mit bekannten Fe²⁺-Konzentrationen können anhand der Absorption der Lösungen bei einer Wellenlänge von 595 nm die Fe²⁺-Konzentrationen der Proben berechnet werden.

Um eine spontane Oxidation von Fe²⁺ mit dem Luftsauerstoff zu verhindern, müssen die zu untersuchenden Lösungen mit 0,1 M HCl angesäuert werden. Die hier verwendeten Proben wiesen allerdings schon einen pH-Wert von 2,5 auf, wodurch ein Ansäuern nur zur Erstellung der Eichgeraden nötig war. Da der Komplex aus Fe²⁺ und Ferrozine allerdings nur bei pH-Werten zwischen 4 und 9 stabil ist, wurde eine 0,1 %-ige (w/v) Ferrozinelösung mit 50 % (w/v) Ammoniumacetat gepuffert. Im Folgenden wurden 20 µl einer Probe mit 180 µl Ferrozine-Ammoniumacetat-Lösung versetzt und die Absorption der Proben in einer Mikrotiterplatte bei einer Wellenlänge von 595 nm mit einem Microplate Reader iMark™ (Bio-Rad, München) gemessen.

4 Ergebnisse

In dieser Arbeit wurden acidophile Archaeen aus einem sauren Biofilm der ehemaligen Pyritmine „Drei Kronen und Ehart“ im Harz angereichert, die Ko-Kulturen sowohl bioinformatisch, als auch physiologisch charakterisiert und Organismen aus den Ko-Kulturen isoliert. Ein besonderer Schwerpunkt war die Anreicherung und Charakterisierung der in den Kulturen vorkommenden ARMAN. Zudem sollte geklärt werden, ob und wie die Nanoorganismen in Abhängigkeit zu anderen Vertretern der Kulturen stehen.

In einer vorangegangenen Masterarbeit (Krause, 2013) wurden Vorläufer dieser Kulturen bereits mehrere Male überimpft, wobei mit unterschiedlichen Strategien versucht wurde, Archaea anzureichern und zu isolieren. Zu Beginn wiesen diese Kulturen eine hohe Diversität auf und enthielten Bacteria, Archaea aus der Ordnung der *Thermoplasmatales* und einen Pilz. Zum Ende der Arbeit konnten durch die Zugabe mehrerer Antibiotika zum Medium keine Bacteria mehr mittels CARD-FISH nachgewiesen werden. Fe(III)SO_4 ebenso wie eine organische Kohlenstoffquelle (Hefeextrakt, Caseinhydrolysat) erwiesen sich als essentielle Komponenten des Mediums, ohne die keinerlei Wachstum detektiert werden konnte. Isolierungsversuche mithilfe von Agarose- und Gelrite-Platten blieben erfolglos.

4.1 454 Sequenzierung

Um die Ergebnisse der vorangegangenen Masterarbeit zu verifizieren, wurde zu Beginn dieser Arbeit nach zwei weiteren Überimpfungen der Anreicherungskulturen eine 454-Sequenzierung durchgeführt. Hierfür wurde DNA über das innuSPEED soil DNA Kit von Analytik Jena (Kapitel 3.2.1) isoliert. Da Zellen mit diesem Kit chemisch, thermisch und mechanisch aufgeschlossen werden, sollte sichergestellt werden, dass DNA aus allen in den Kulturen vorkommenden Organismen isoliert wurde. Eine anschließende PCR mit universellen Primern für Bacteria und Archaea bei einer sehr niedrig gewählten Annealingtemperatur sollte weiterhin eine möglichst umfassende Amplifikation aller vorkommenden 16S rDNA-Sequenzen gewährleisten. Die amplifizierte DNA wurde bei der Firma IMG^M Laboratories GmbH mithilfe einer 454-Sequenzierung analysiert (Kapitel 3.3.2) und danach bioinformatisch über das Programm QIIME (Kapitel 3.4.1) ausgewertet. Die einzelnen Reads wurden hier zu OTUs zusammengefügt und mit der Datenbank des RDP

Classifiers abgeglichen, was sowohl eine qualitative, als auch eine quantitative Analyse der Daten ermöglichte. Abb. 4-1 zeigt die Ergebnisse der 454-Sequenzierung für Sequenzen, welche mit Bacteria-Primern amplifiziert wurden und Sequenzen, die mit Archaea-Primern amplifiziert wurden.

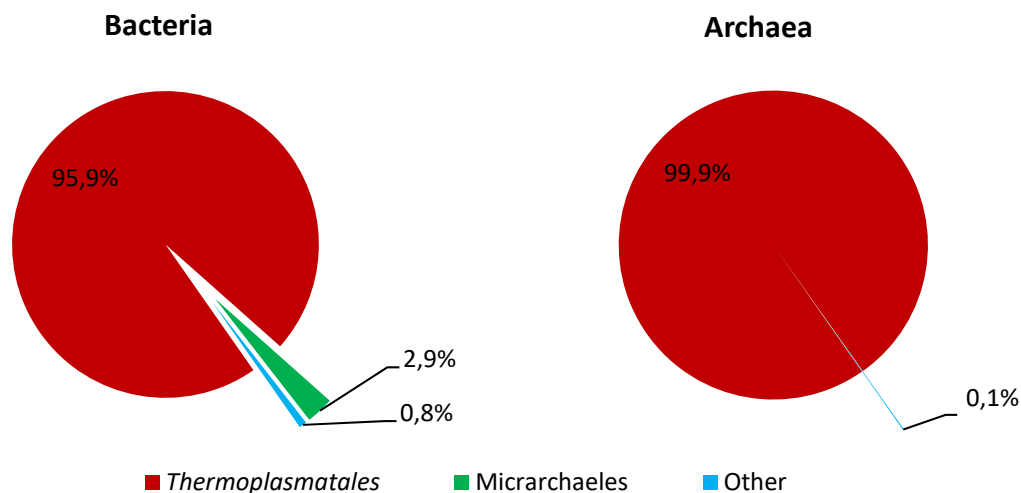


Abb. 4-1: Phylogenetische Diversität der Anreicherungskulturen basierend auf den Ergebnissen der 454-Sequenzierung.

Deutlich erkennbar ist die laut 454-Sequenzierung extrem geringe Diversität der Kulturen. Mithilfe der Bacteria-Primer konnten mit 95,9 % aller Sequenzen hauptsächlich 16S rDNA Sequenzen amplifiziert werden, welche laut RDP Classifier auf Vertreter der Ordnung *Thermoplasmatales* zurückzuführen sind. 2,9 % machten Sequenzen aus, die zu den *Micrarchaeles* gezählt werden. Die verbliebenen 1 % setzten sich aus diversen Sequenzen zusammen, die meist zu einem Prozentsatz von nur 0,1 in der Analyse zu finden waren (siehe Tab. 4-1). Die Ergebnisse der 16S rRNA Amplifizierung mit Archaeen-spezifischen Primern zeigten eine noch größere Homogenität mit einem Anteil von 99,9 % der Sequenzen, welche den *Thermoplasmatales* zugeordnet werden konnten.

Als Konsequenz aus den Ergebnissen der 454-Sequenzierung wurde die Antibiotikazugabe in den nachfolgenden Kulturen deutlich reduziert. Da aber sporenbildende Bakterien als Teil der Ko-Kulturen in der Vergangenheit nicht ausgeschlossen werden konnten, kam vorerst noch Vancomycin zum Einsatz, wobei alle Kulturen streng auf ein mögliches Wachstum von Bacteria kontrolliert wurden.

Tab. 4-1: Ergebnisse der 454-Sequenzierung, prozentuale Verteilung der OTUs.

Taxonomie	%
Bacteria-Primer	
k__Archaea;p__Euryarchaeota;c__Thermoplasmata;o__Thermoplasmatales	0,1
k__Archaea;p__Euryarchaeota;c__Thermoplasmata;o__Thermoplasmatales	95,8
k__Archaea;p__Euryarchaeota;c__[Micrarchaea];o__[Micrarchaeles]	2,9
k__Bacteria;p__Actinobacteria;c__Actinobacteria;o__Actinomycetales	0,1
k__Bacteria;p__Firmicutes;c__Bacilli;o__Bacillales	0,1
k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Betaproteobacteria;o__Burkholderiales	0,1
k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Gammaproteobacteria;o__Enterobacteriales	0,4
k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Gammaproteobacteria;o__Oceanospirillales	0,1
Archaea-Primer	
k__Archaea;p__Euryarchaeota;c__Thermoplasmata;o__Thermoplasmatales	0,9
k__Archaea;p__Euryarchaeota;c__Thermoplasmata;o__Thermoplasmatales	99
k__Bacteria; Other	0,1

4.2 Metagenom

Nach insgesamt 2,5 Jahren Kultivierung waren die Kulturen in ihrem Wachstumsverhalten relativ stabil und konnten im Schnitt alle 10 Wochen überimpft werden. Zu diesem Zeitpunkt waren laut 454-Sequenzierung und CARD-FISH Analysen mindestens ein Vertreter der *Thermoplasmatales*, eine ARMAN-verwandte Art und ein Pilz in den Kulturen vertreten (Abb. 4-1 und Abb. 4-2).

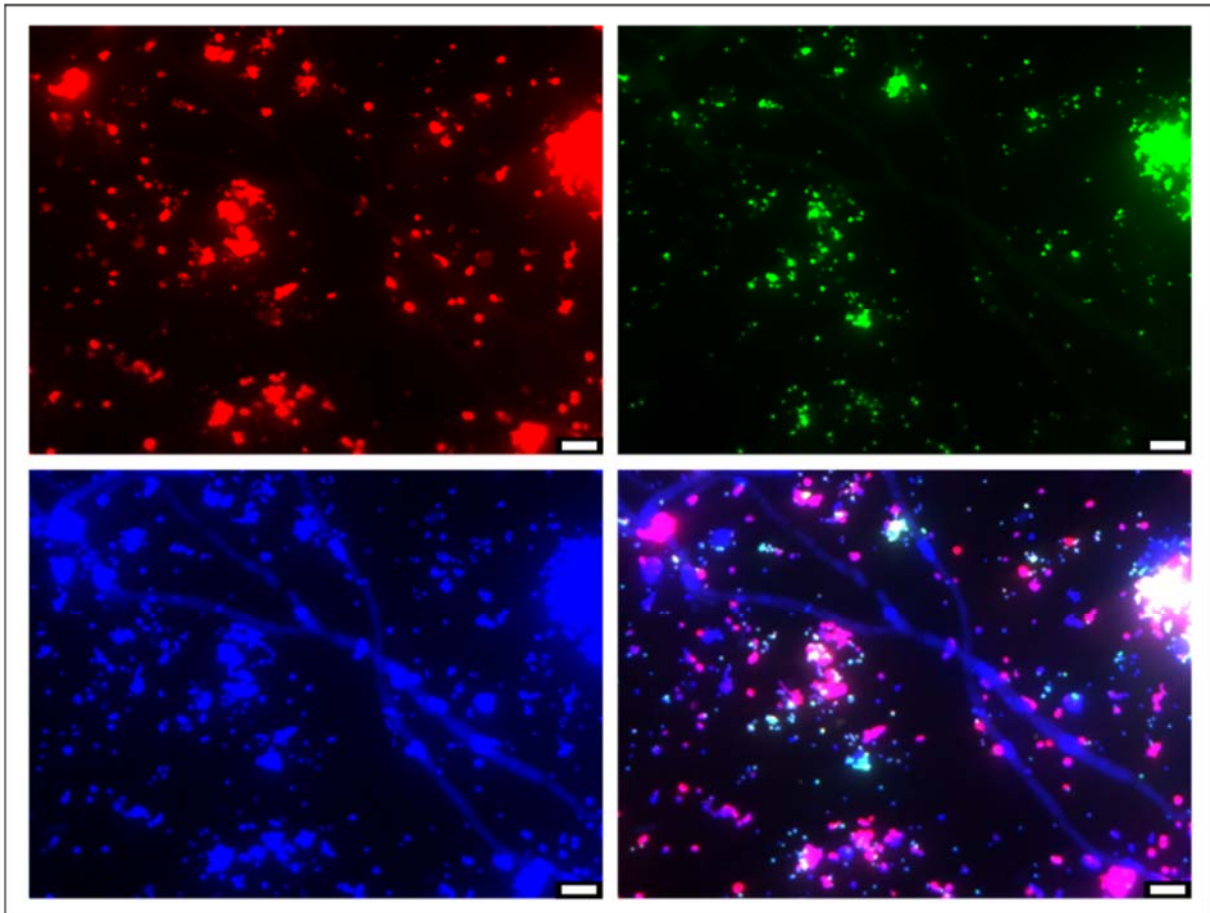


Abb. 4-2: CARD-FISH Bilder der Anreicherungskulturen. Gefärbt wurden in rot Archaea (ARCH915, Alexa 564) und in grün ARMAN (ARM980, Alexa 488). In blau erkennbar die DAPI Gegenfärbung. (1000-fache Vergrößerung). Die Größenbalken entsprechen in jedem Bild 10 μm . Die Belichtungszeiten wurden wie in Kap. 3.5 beschrieben entsprechend angepasst.

Um einen tieferen Einblick in die Zusammensetzung der Kulturen zu erhalten, wurde DNA aus gut gewachsenen Ko-Kulturen isoliert, um nach einer Illumina-Sequenzierung das Metagenom der Kulturen zu analysieren. Für die Illumina-Sequenzierung musste eine möglichst schonende Methode zur Aufreinigung der DNA gewählt werden, weswegen ein zuvor erfolgreich von Lo *et al.* (2007) angewandtes Protokoll zur Erstellung eines Metagenoms von Biofilmen aus den Iron Mountains gewählt wurde (siehe Kapitel 3.2.2). Die Sequenzierung fand am Institut für Toxikologie und Genetik am Campus Nord des KIT statt (Kapitel 3.3.3). Die Auswertung der Metagenome erfolgte in Kooperation mit Dr. Andreas Bremges und Philipp Münch unter der Leitung von Prof. Alice McHardy vom Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung in Braunschweig.

In Tab. 4-2 sind die Rohdaten der Sequenzierungsergebnisse dargestellt.

Tab. 4-2: Rohdaten der Sequenzierungsergebnisse.

Datenset	Anzahl der Reads	Anzahl der Basen
S1	293.819.146	14.984.776.446
S2	227.249.154	11.589.706.854
Gesamt	521.068.300	26.574.483.300

Die Illumina-Sequenzierung ergab insgesamt 26,5 Gbp Sequenzierungsdaten, aufgeteilt in zwei biologische Replikate

Für das Assembly wurden die Reads beider Replikate mit Ray Meta assembled (Kapitel 3.4.2). Das Binning des Metagenom Assemblys erfolgte über MetaBAT und ergab am Ende drei unterschiedliche Genom Bins. Anschließend wurde mittels CheckM die Vollständigkeit und Kontamination jedes Bins kontrolliert. Tab. 4-3 gibt einen Überblick über die Assembly und Binning Statistiken.

Tab. 4-3: Assembly und Binning Statistiken des analysierten Metagenoms.

Assembly	A	B	C	Gesamt
Assembly Größe [bp]	976.441	1.905.249	1.606.190	4.904.630
Anzahl der Contigs	7	31	3	145
N50 [bp]	194.415	82.562	1.202.937	178.318
Längstes Contig [bp]	336.535	235.491	1.202.937	1.202.937
Anzahl der Gene	1.013	2.016	1.556	5.272
GC [%]	45,78	44,47	37,72	n/a
Coding density [%]	91,47	87,4	89,21	n/a
Vollständigkeit	81,78	98,61	86,29	n/a
Kontamination	0,93	0	0	n/a

Die drei rekonstruierten Genome haben eine Größe von ca. 1 Mbp, 1,9 Mbp und 1,6 Mbp, wobei die Anzahl der erwarteten Gene proportional zur Genomgröße ist. Damit zeigen alle drei Genome eine ähnlich hohe Gendichte von um die 90 %. Die Vollständigkeit des Genoms B ist mit 98,6 % sehr hoch, wobei die beiden anderen Genome mit 81,8 % bzw. 86,3 % einen geringeren Wert aufweisen.

Eine taxonomische Auswertung jedes einzelnen Contigs des Metagenoms über taxator-tk bekräftigte die Ergebnisse der vorangegangenen 454-Analysen (Abb. 4-3). 71 % bzw. 88 % der Sequenzen konnten Archaea zugeordnet werden, wobei gut die Hälfte bzw. 29 % bis zur Ordnung der *Thermoplasmatales* herunter zuzuordnen war. Sequenzen zugehörig zu ARMAN-verwandten Organismen konnten aufgrund der geringen Verfügbarkeit von

Referenzgenomen in öffentlichen Datenbanken mit der Taxator-tk Software nur bis zur Domäne der Archaea zuverlässig identifiziert werden. Die übrigen Sequenzen konnten nicht zugeordnet werden. Ebenso tauchten in den Analysen keine Sequenzen auf, welche dem in den Kulturen vorkommenden Pilz zugeordnet werden konnten.

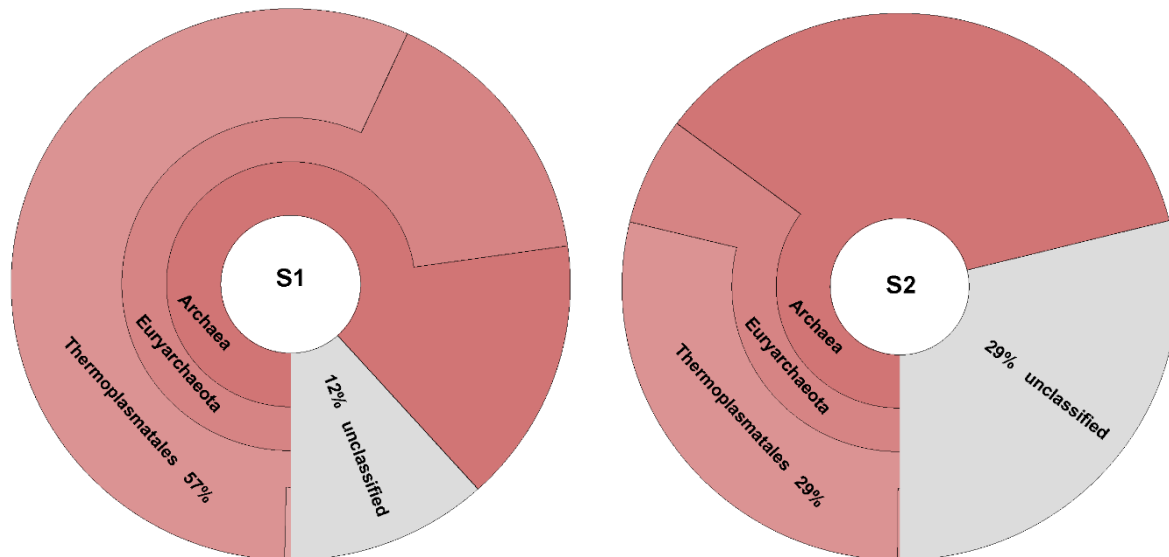


Abb. 4-3: Taxonomisches Profil der beiden Metagenom Replikate, visualisiert über Krona.

Die aus dem Metagenom rekonstruierten 16S rDNA Sequenzen konnten drei unterschiedlichen Archaea zugeordnet werden. Abb. 4-4 zeigt einen phylogenetischen Stammbaum der 16S rDNA Sequenzen der detektierten Archaea.

Die dominante Art (siehe Tab. 4-4) in den Anreicherungskulturen war ein neuer, bisher unkultivierter Vertreter der *Thermoplasmatales*. Dieser ist laut Analyse der 16S rDNA nächstverwandt zu *Thermogymnomonas acidicola* (91,6 % identity, 1206 bp) und *Cuniculiplasma divulgatum* (91,7 % identity, 1206 bp). Das zweite Genom beinhaltete eine 16S rDNA Sequenz, welche eine 99 %-ige Identität zu ARMAN-1 hat, welcher von Baker *et al.* im Jahr 2006 erstmals über Metgenomanalysen eines acidophilen Biofilms in den Iron Mountains in Kalifornien gefunden wurde. Das dritte und deutlich unterrepräsentierte Genom zeigte eine 100 %-ige Übereinstimmung mit *Cuniculiplasma divulgatum*, einem kürzlich isolierten Vertreter der *Thermoplasmatales* und zu Gplasma, einem Vertreter der „Alphabet Plasmas“ (Yelton *et al.*, 2013).

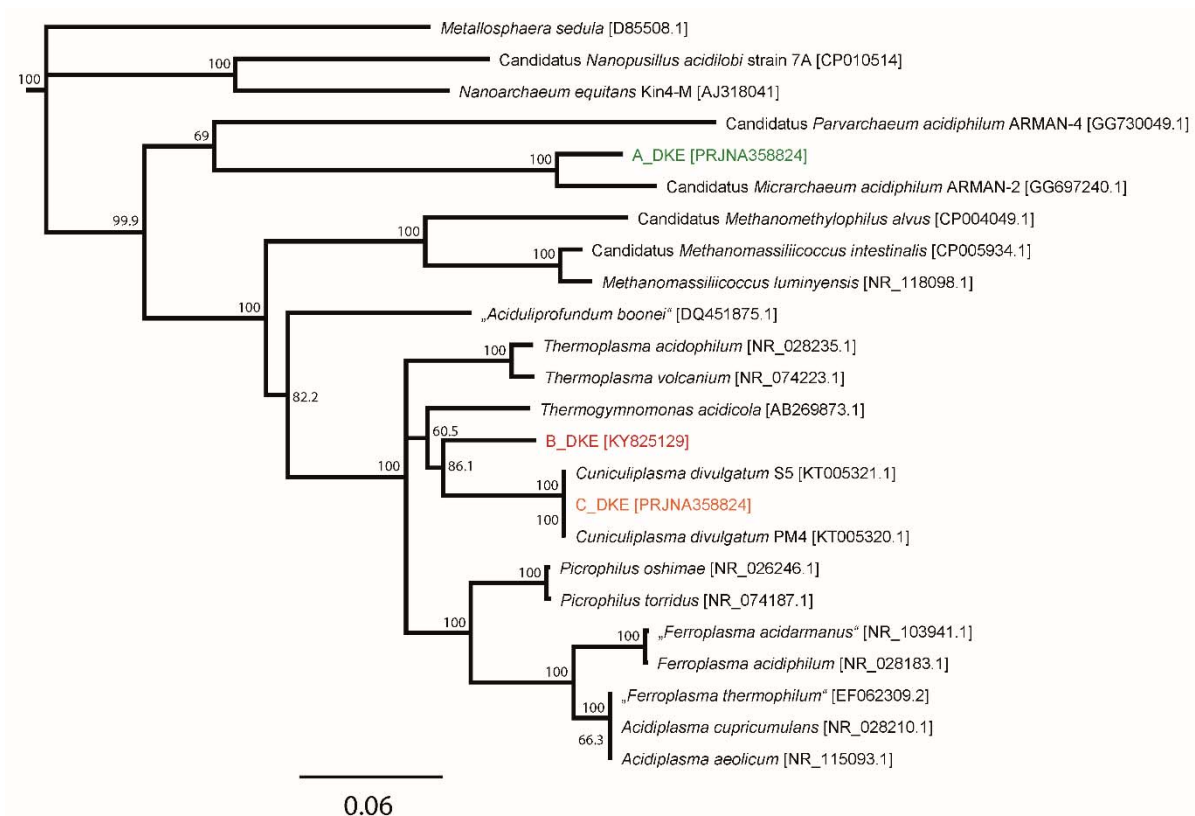


Abb. 4-4: Phylogenetischer Stammbaum der 16S rDNA Sequenzen der in den Anreicherungskulturen gefundenen Archaea und deren nächstverwandte Organismen. Für die Erstellung wurde die Neighbour Joining Methode gewählt, mit einem auf dem Muscle Alignment basierenden Datenset. Bootstrap Values von 1000 Replikaten wurden berechnet, wobei nur Werte >50 gezeigt werden. Die publizierte 16S rDNA Sequenz von ARMAN-1 wurde aus der Analyse ausgeschlossen, da die Sequenz unvollständig und damit viel kürzer als die anderen verwendeten Sequenzen ist.

Tab. 4-4: Anteil der gemappten Reads der einzelnen Genome an der Gesamtheit.

Mapped reads	A_DKE [%]	B_DKE [%]	C_DKE [%]
S1	23,32	66,48	8,13
S2	61,52	35,00	1,49

In den nachfolgenden Abschnitten wird der zu ARMAN-1 nah verwandte Organismus als A_DKE (ARMAN Drei Kronen und Ehrt) bezeichnet, der neue Vertreter innerhalb der *Thermoplasmatales* als B_DKE und der Organismus mit vollständiger Übereinstimmung zu *Cuniculiplasma divulgatum* als C_DKE (Cuniculiplasma Drei Kronen und Ehrt).

Die Genome der drei in den Ko-Kulturen vorkommenden Archaea wurden mit den Genomen ihrer nächstverwandten Organismen verglichen.

Zunächst wurde die Gesamtanzahl der in den Genomen gefundenen Genfamilien und deren Anteil am Gesamtgenom ermittelt. Hierzu wurden Cluster orthologer Gene mittels OrthoMCL abgeleitet und für deren Annotation das HMMER toolkit verwendet (Kapitel 3.4.2). Abb. 4-5 (a) zeigt einen Überblick über die Anzahl der in den Genomen vorkommenden orthoMCL Familien. Generell zeigen die Genome der *Thermoplasmatales* erwartungsgemäß eine größere Anzahl an Genfamilien, als die der ARMAN-verwandten Organismen, wobei C_DKE zusammen mit *Ferroplasma acidarmanus* und *Cuniculiplasma divulgatum* S5 mit die größte Anzahl von um die 2000 Genfamilien aufweist. *Thermogymnomonas acidicola* bildet hier mit über 3000 Genfamilien eine Ausnahme. A_DKE hat vergleichbar viele Genfamilien wie ARMAN-2, wobei in ARMAN-4 und ARMAN-5 nochmals deutlich weniger Genfamilien zu detektieren waren.

Des Weiteren konnten signifikante Unterschiede in der Anzahl der orthoMCL Familien zwischen *Thermoplasmatales* und ARMAN-verwandten Organismen detektiert werden (Abb. 4-5 (b)). Die größten Unterschiede wurden in Genfamilien zugehörig zur Translation, zum Aminosäuremetabolismus, dem Kohlenhydratmetabolismus und dem Metabolismus von Cofaktoren und Vitaminen gefunden. Vergleicht man nun den Anteil der untersuchten Genfamilien von C_DKE mit *C. divulgatum*, so wird deutlich, dass die fünf Genfamilien, u.a. zuständig für den Membrantransport, Kohlenstoffmetabolismus und Metabolismus von Cofaktoren und Vitaminen, eine andere Verteilung aufweisen. Auch A_DKE zeigt eine andere Verteilung im Vergleich zu den anderen ARMAN.

Ein auf dem Prozentsatz an geteilten Genfamilien basierendes hierarchisch clusterndes Dendrogramm aller analysierten Genome unterstreicht die in Abb. 4-5 (c) dargestellte Verwandtschaft von B_DKE zu *T. acidicola* und *Thermoplasma sp.*. A_DKE clustert erwartungsgemäß zusammen mit den anderen ARMAN-Spezies, wobei auch hier wieder die engere Verwandtschaft zu ARMAN-2 deutlich wird.

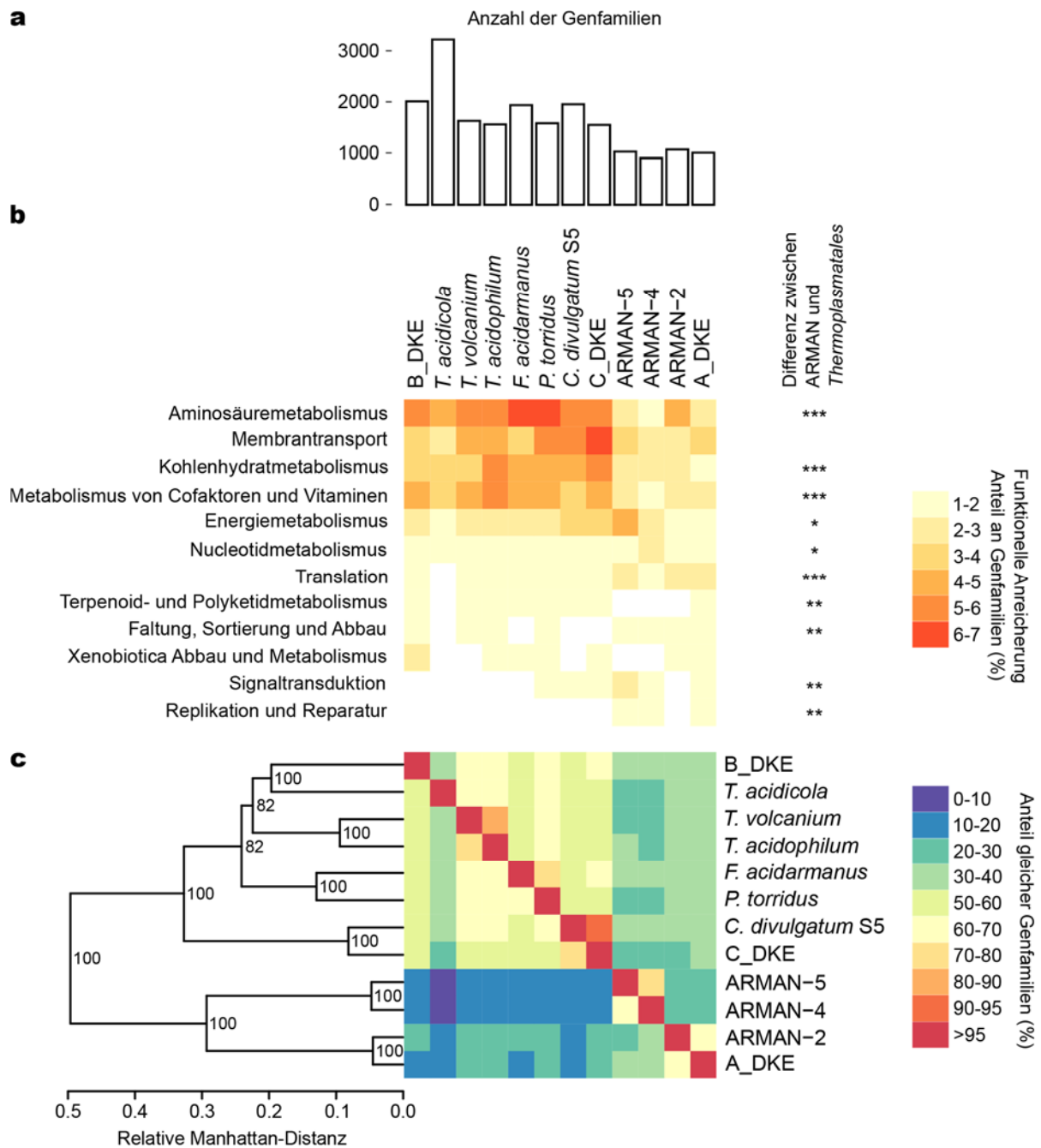


Abb. 4-5: Vergleich orthologer Gruppen analysiert über orthoMCL Familien der angezeigten Genome.
 (a) Anzahl orthologer Gruppen analysiert über orthoMCL Familien der angezeigten Genome.
 (b) Funktionelle Analyse angereicherter orthologer Gene. Die Heatmap stellt den Prozentsatz von orthoMCL Gruppen der angezeigten funktionellen Kategorien jedes Genoms dar. Sterne zeigen FDR (False Discovery Rate) Signifikanzlevel für Unterschiede in der Anzahl von orthoMCL Familien der vier ARMAN Genome und acht *Thermoplasmales* Genome (ein Stern steht für ein Level unter 0,05, zwei für 0,01 und drei für 0,001).
 (c) Heatmap und hierarchisch clusterndes Dendrogramm, welches den Prozentsatz der von den Genomen geteilten Genfamilien darstellt. Bezeichnungen der Knoten stehen für Bootstrap Werte nach 100 Durchläufen. Spalten wurden auf die Kompletanzahl der Genfamilien der Genome normalisiert.

Auch ein Vergleich der KEGG-terms macht die nähere Verwandtschaft von ARMAN-2 und A_DKE deutlich, welche sich untereinander sichtbar mehr Terme teilen, als mit ARMAN_4 und ARMAN-5. Proteincodierende Gene des Zentralmetabolismus der einzelnen Genome

wurden in der Abbildung farblich gekennzeichnet. So ist erkennbar, dass sich alle ARMAN-Spezies Gene für den Citratzyklus teilen, ebenso wie Gene für die Atmung. Dahingegen sind Gene, welche in die Glykolyse/Glukoneogenese, den Pentosephosphatweg, den Entner-Doudoroff Weg und die β -Oxidation involviert sind, sehr ungleichmäßig in den unterschiedlichen Genomen verteilt, was deutliche Unterschiede im Zentralmetabolismus der einzelnen ARMAN-Spezies kennzeichnet.

Ein Vergleich von Genfamilien, welche sowohl in ARMAN-2, ARMAN-4 und ARMAN-5 vorkommen, mit denjenigen in A_DKE, macht ein Kerngenom von 228 Genen deutlich, welche in allen bisher veröffentlichten ARMAN-Spezies zu finden sind (Abb. 4-6 (c)). A_DKE differenziert sich von den anderen ARMAN-Spezies mit 227 Genen, welche nur im Genom von A_DKE zu finden sind. ARMAN-2, -4 und -5 teilen sich hingegen 9 Gene, welche nicht in A_DKE vorkommen. 15 der 227 für A_DKE einzigartigen Gene konnten annotiert werden (Tab. A-3).

Darüber hinaus zeigt ein Vergleich der prozentualen Anzahl an Genfamilien, dass das Genom von A_DKE mehr Genfamilien für den Benzoatabbau, das Phosphotransferasesystem, den Abbau von aromatische Substanzen und den Aminosäuremetabolismus enthält, als die der anderen drei ARMAN-Spezies, in welchen mehr Genfamilien für die oxidative Phosphorylierung, das Zwei-Komponenten-System und Amino- und Nucleotidzucker-Metabolismus vorkommen (Abb. 4-6 b).

Eine genaue Analyse der Zentralstoffwechselwege von A_DKE zeigt codierende Bereiche für einen kompletten Citratzyklus auf (Tab. A-5). Ebenso wurden Enzyme für den nicht-phosphorylierten Entner-Doudoroff Weg gefunden, wobei jedoch das Schlüsselenzym, die KDP-Aldolase, fehlte. Proteincodierende Gene für die Glykolyse oder die Gluconeogenese konnten ebenfalls nicht detektiert werden. Die Atmungskette betreffend wurde jeweils ein Set an Enzymen für Komplex I und Komplex V identifiziert. Darüber hinaus konnten nur zwei Enzyme ermittelt werden, welche eine Rolle im Pentosephosphatweg spielen. Auch für die β -Oxidation waren ausschließlich eine 3-Hydroxyacyl-CoA Dehydrogenase und eine Acetyl-CoA Thiolase zu detektieren.

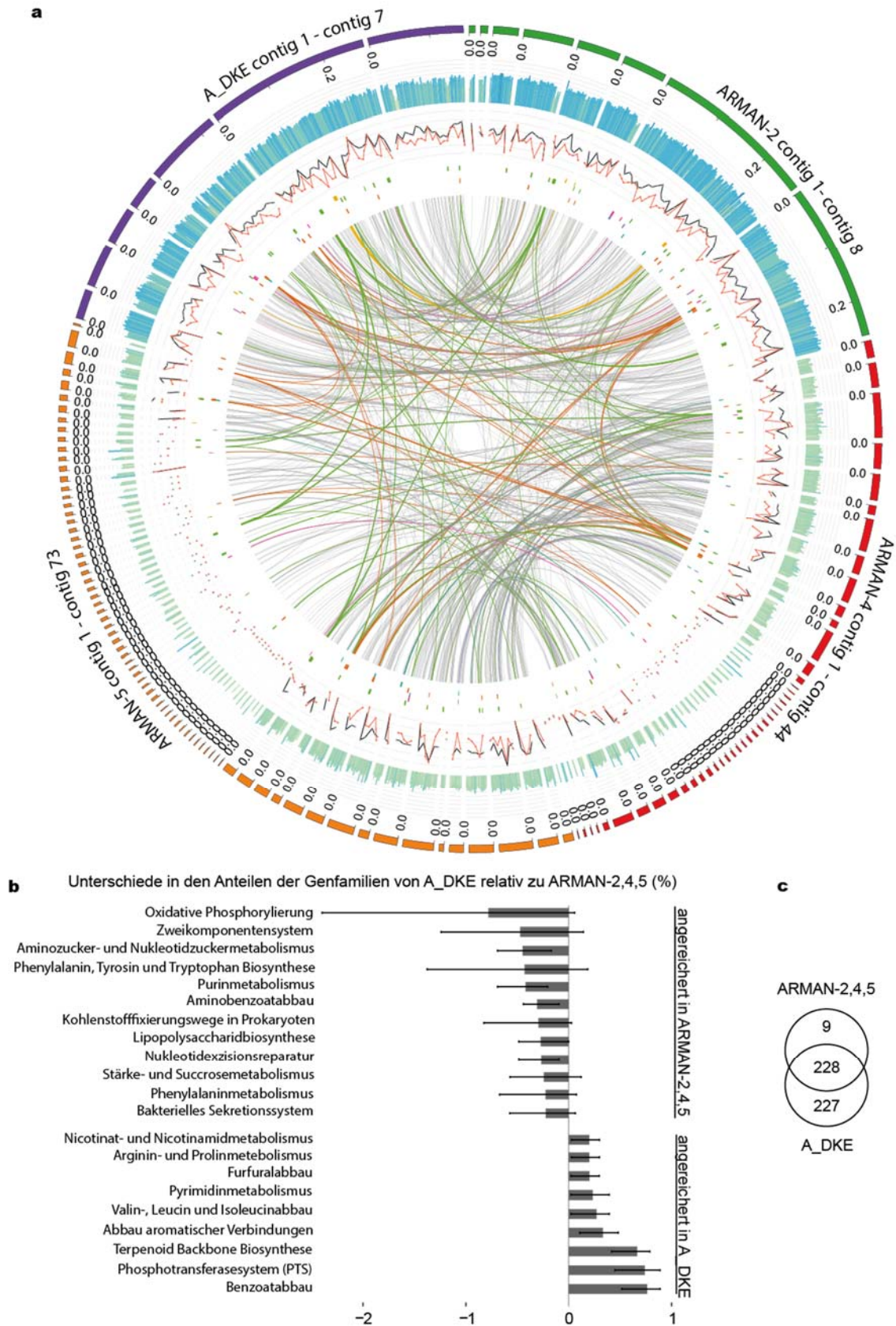


Abb. 4-6: (a) Genomvergleich von ARMAN-2/-4/-5 und A_DKE, generiert über Donut (unpubliziert). Von außen nach innen: (1) GC Gehalt (höhere Werte in blau, niedrigere in grün). (2) ORF Dichte (annotiert und hypothetisch) innerhalb eines sliding windows von 10000 bp über die Genome visualisiert in schwarz. ORF-Dichte der hypothetischen ORFs sind in rot visualisiert, basierend auf einem sliding window-Ansatz. (3-8) Treffer mit KEGG-Termen in folgender Reihenfolge: beta-Oxidation (gelb), oxidative Phosphorylierung (grün),

Entner-Doudoroff Weg (pink), Pentosephosphatweg (lila), Citratzyklus (orange), Glykolyse/Gluconeogenese (blau). Linien innerhalb der Abbildung indizieren Signifikanz zwischen ORFs der individuellen Genome und sind entsprechend der KEGG-Terme eingefärbt, wenn diese komplett übereinstimmen. Contig-Größen in Mbp. (b) Balkendiagramm, welches die Häufigkeit des Auftretens von funktionellen Gruppen basierend auf *de novo* abgeleiteten Genfamilien, basierend auf orthoMCL Analysen der drei ARMAN-Genome und des A_DKE Genoms darstellt. Die Länge der Balken entspricht der mittleren Abweichung im Anteil der Genfamilien der dargestellten funktionellen Gruppen. Die Linien zeigen den Unterschied zu den ARMAN-Genomen mit minimalem und maximalem Wert an. Es werden nur funktionelle Gruppen angezeigt, welche sich mehr als 0,2 % oder -0,2 % unterscheiden. (c) Venndiagramm für die Anzahl an gleichen und einzigartigen Genfamilien. Genfamilien mit Pathogenitätsfaktor werden nicht angezeigt.

Der genomische Vergleich von B_DKE und C_DKE mit den Genomen ihrer nächstverwandten Organismen bekräftigt die nahe Verwandtschaft von C_DKE und *C. divulgatum* S5 (Abb. 4-7 (a)). B_DKE teilt sich hingegen die wenigsten Gene mit den anderen analysierten *Thermoplasmales*. C_DKE und *C. divulgatum* sind erwartungsgemäß ähnlich niedrige GC-Werte gemein. Das Genom von B_DKE hingegen zeigt etwas höhere GC-Gehalte, wobei *T. acidicola* mit Abstand die höchsten Werte aufweist. Im Vergleich mit den Genomen der ARMAN-verwandten Organismen ist der Anteil an hypothetischen Genen bei den *Thermoplasmales* deutlich geringer. Die Verteilung der Gene für die zentralen Stoffwechselwege der vier verschiedenen *Thermoplasmales* Arten ist recht homogen, wobei alle Stoffwechselwege vertreten sind und keine großen Unterschiede zwischen den Genomen erkennbar sind.

Beim Vergleich der Genfamilien von B_DKE und *T. acidicola* ist das mit 2073 einzigartigen Genfamilien deutlich größere Genom von *T. acidicola* erkennbar (Abb. 4-7 (c)). C_DKE grenzt sich von *T. acidicola* mit 861 Genfamilien ab, wobei sich beide Organismen 1030 Genfamilien teilen. Trotz der 100 %-igen Übereinstimmung der 16S rDNA Sequenzen von C_DKE und *C. divulgatum* besitzt das Genom von C_DKE 80 einzigartige Genfamilien, wobei sich beide Organismen 1426 Genfamilien teilen. B_DKE und C_DKE teilen 977 Genfamilien, wobei B_DKE 914 einzigartige Genfamilien innehat und C_DKE 529.

Beim genaueren Vergleich der Verteilung der Genfamilien von B_DKE und C_DKE ist zu erkennen, dass B_DKE deutlich mehr Genfamilien zugehörig zu ABC-Transportern, dem Zwei-Komponenten System oder auch der oxidativen Phosphorylierung besitzt (Abb. 4-7 (b)). In C_DKE sind hingegen mehr Genfamilien zugehörig zum Furfural-Abbau, dem Phosphotransferase System oder dem Vitamin B6 Metabolismus vertreten.

Die Auswertung der einzelnen proteincodierenden Gene für die zentralen Stoffwechselwege von B_DKE und C_DKE indizieren für beide Organismen einen vollständigen Citratzyklus. Darüberhinaus konnten in beiden Organismen codierende Bereiche für alle Enzyme der Gluconeogenese gefunden werden. Ein Zuckerabbau über die Glykolyse kann aufgrund des Fehlens einer Phosphofruktokinase hingegen ausgeschlossen werden. Stattdessen wurde in beiden Genomen eine von Say und Fuchs (2010) publizierte bifunktionelle Fructose-1,6-bisphosphat Aldolase-Phosphatase detektiert, welche einen unidirektionalen Gluconeogenese gewährleistet. Für den Zuckerabbau wurden im Genom von B_DKE fast alle Enzyme für den verzweigten Entner Doudoroff Weg (ED) gefunden, inklusive des Schlüsselenzyms KDP-/KDPG-Aldolase. Allerdings konnte für den semi-phosphorylierten Teil des verzweigten ED Wegs keine KDG-Kinase detektiert werden. Auch das Genom von C_DKE wies codierende Bereiche für fast alle Enzyme des nicht-phosphorylierten Entner-Doudoroff Weges auf, bis auf das Schlüsselenzym KDG-Aldolase. Hingegen konnten in den Genomen beider *Thermoplasmatales* alle Enzyme für den oxidativen Pentosephosphatweg detektiert werden. Demgegenüber fehlen beiden Organismen die für die β -Oxidation essentielle β -Hydroxyacyl-CoA Dehydrogenase und B_DKE fehlt zusätzlich die β -Hydroxyacyl-CoA Dehydratase. Als Teile der Atmungskette wurden in den Genomen von B_DKE und C_DKE Gene für die Komplexe I, II und V detektiert. Darüberhinaus konnte in beiden Organismen ein Rieske/FeS Protein als Schlüsselkomponente des Komplex III gefunden werden, welches in B_DKE ein Gencluster mit einem Cytochrom b_6 -ähnlichen Protein bildet. Darüberhinaus enthielten beide Genome codierende Bereiche für eine Cytochrom c Oxidase, wobei jedoch kein Cytochrom c detektiert werden konnte. Weiterhin enthielt das Genom von B_DKE ein Gen für ein Kupfer-Protein.

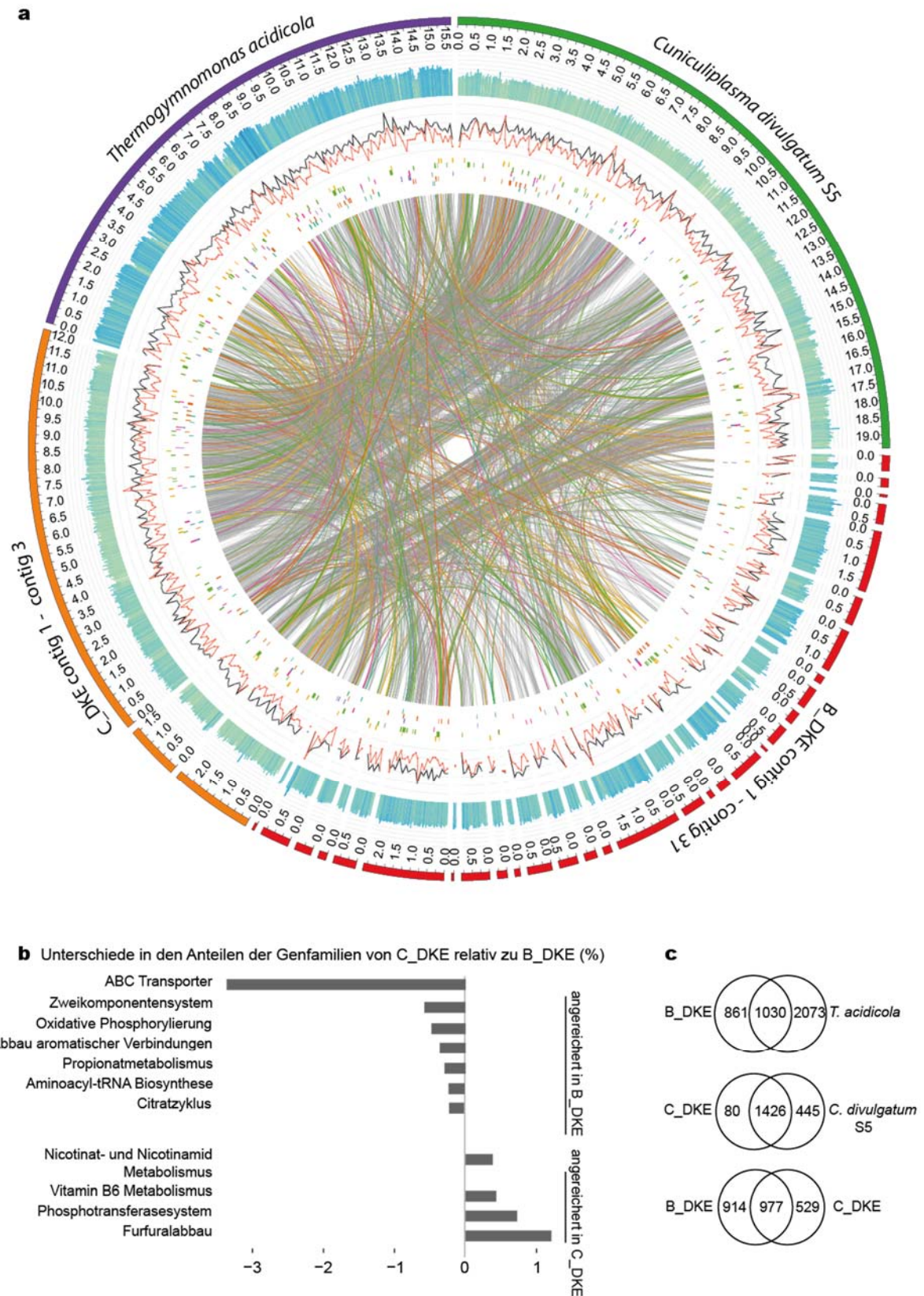


Abb. 4-7: (a) Genomvergleich von *C. divulgatum S5*, B_DKE, C_DKE und *T. acidicola*, generiert über Donut (unpubliziert). Von außen nach innen: (1) GC Gehalt (höhere Werte in blau, niedrigere in grün). (2) ORF Dichte (annotiert und hypothetisch) innerhalb eines sliding windows von 10000 bp über die Genome visualisiert in schwarz. ORF-Dichte der hypothetischen ORFs sind in rot visualisiert, basierend auf einem sliding window-Ansatz. (3-8) Treffer mit KEGG-Termen in folgender Reihenfolge: beta-Oxidation (gelb), oxidative

Phosphorylierung (grün), Entner-Doudoroff Weg (pink), Pentosephosphatweg (lila), Citratzyklus (orange), Glykolyse/Gluconeogenese (blau). Linien innerhalb der Abbildung indizieren Signifikanz zwischen ORFs der individuellen Genome und sind entsprechend der KEGG-Terme eingefärbt, wenn diese komplett übereinstimmen. Contig-Größen in Mbp. (b) Balkendiagramm, welches die Häufigkeit des Auftretens von funktionellen Gruppen basierend auf *de novo* abgeleiteten Genfamilien, basierend auf orthoMCL Analysen der drei ARMAN-Genome und des A_DKE Genoms darstellt. Die Länge der Balken entspricht der mittleren Abweichung im Anteil der Genfamilien der dargestellten funktionellen Gruppen. Die Linien zeigen den Unterschied zu den ARMAN-Genomen mit minimalem und maximalem Wert an. Es werden nur funktionelle Gruppen angezeigt, welche sich mehr als 0,2 % oder -0,2 % unterscheiden. (c) Venndiagramm für die Anzahl an gleichen und einzigartigen Genfamilien. Genfamilien mit Pathogenitätsfaktor werden nicht angezeigt.

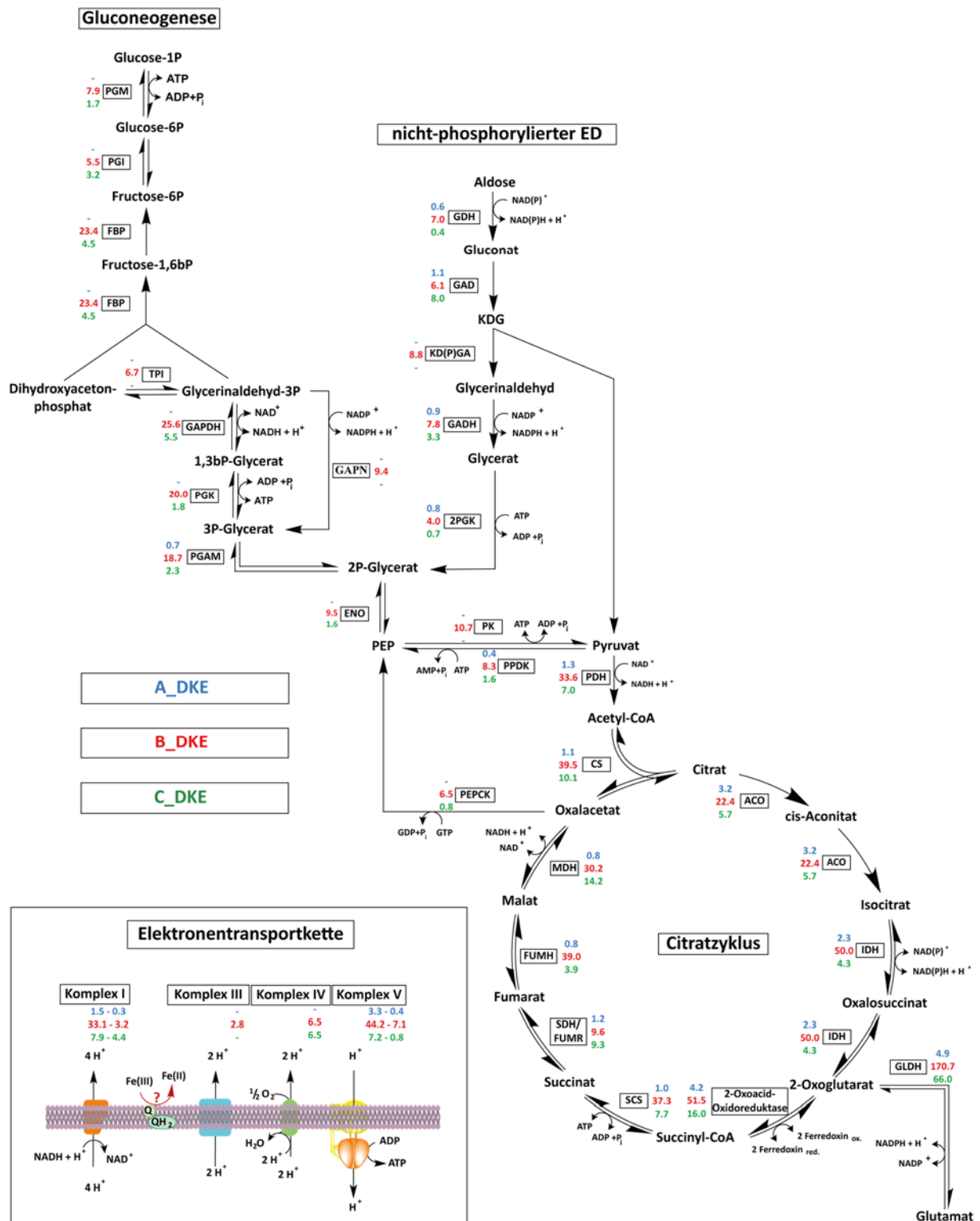
4.3 Metatranskriptom

Um einen genaueren Einblick in die Stoffwechselfvorgänge innerhalb der Community und der einzelnen Vertreter der Ko-Kulturen zu erhalten, wurde zunächst RNA aus gut gewachsenen Kulturen wie in Kapitel 3.2.2 beschrieben isoliert. Die Sequenzierung der RNA erfolgte ebenfalls am Institut für Toxikologie und Genetik am Campus Nord des KIT und wurde wie in Kapitel 3.3.3 beschrieben durchgeführt. Die bioinformatische Analyse wurde von Dr. Andreas Bremges unter der Leitung von Prof. Alice McHardy vom Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung in Braunschweig durchgeführt.

Hierfür wurden die erstellten Contigs mit Prokka annotiert, anschließend mittels BEDtools die Reads pro Gen gezählt und schließlich zur Ermittlung der RPKM-Werte normalisiert. Zugehörige KEGG IDs wurden mittels KAAS-Webserver bestimmt.

Die Auswertung des Transkriptoms von A_DKE zeigte, dass alle im Genom gefundenen Proteine für die zentralen Stoffwechselwege auch exprimiert wurden (Abb. 4-8). Insgesamt waren die Enzyme des Citratzyklus höher exprimiert, als die für den nicht-phosphorylierten Entner-Doudoroff Weg. Aber auch alle im Genom vorkommenden Enzyme der Atmungskette wurden exprimiert. Insgesamt auffällig war eine sehr hoch exprimierte Glutamat-Dehydrogenase, welche Glutamat zu 2-Oxoglutarat und umgekehrt katalysiert.

Bei der Analyse der 20 am höchsten exprimierten Gene konnten allerdings nur 6 Proteine annotiert werden (Tab. A-6).



Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase [NAD(P)+], 2PGK: Glycerat 2-Kinase, PK: Pyruvatkinase, PDH: Pyruvatdehydrogenase; CS: Citratsynthase, ACO: Aconitase, IDH: Isocitratdehydrogenase, SCS: Succinyl-CoA Synthetase, SDH/FUMR: Succinatdehydrogenase/Fumaratreductase, FUMH: Fumarathydratase, MDH: Malatdehydrogenase.

In B_DKE und C_DKE sind ebenso wie in A_DKE alle im Genom gefundenen Gene des zentralen Stoffwechsels exprimiert. So waren die Gene des nicht-phosphorylierten Entner Duodoroff Weges insgesamt weniger hoch exprimiert, als die Gene für die Gluconeogenese. Der Citratzyklus hat indes die höchsten Expressionsraten. Aber auch die Gene der Atmungskette, vor allem des Komplex I und Komplex V sind hoch exprimiert. Ähnlich wie in A_DKE ist die Glutamat-Dehydrogenase sehr hoch exprimiert und ist in beiden Organismen unter den 20 am höchsten exprimierten Genen. Des Weiteren haben beide Organismen hoch exprimierte Enzyme, welche mit oxidativen Stress in Zusammenhang stehen. Aber auch Enzyme welche an die Elektronentransportkette gekoppelt sind, zeigen hohe Expressionsraten.

4.4 Timeline der Anreicherungskulturen mit A_DKE, B_DKE und C_DKE

Weiterführend zur bioinformatischen Analyse der Ko-Kulturen sollten diese anhand physiologischer Parameter charakterisiert werden. Dies sollte einen tieferen Einblick in die Community, das Wachstumsverhalten und mögliche Interaktionen geben.

Hierzu wurde eine Timeline der Kulturen im Triplikate über insgesamt 11 Wochen erstellt. Die Zellen wurden jede Woche zweimal für CARD-FISH Analysen fixiert und je einmal pro Woche wurden Proben für qPCR und Ferrozine-Test genommen, wobei jedes Mal der pH-Wert kontrolliert wurde. Da eine lichtmikroskopische Auszählung der Zellen zur Erstellung einer Eichgeraden für die qPCR aufgrund der geringen Größe der Archaea und dem Fehlen von Reinkulturen nicht möglich war, wurden Sequenzen der Archaea in das Genom von *E. coli* DH5alphaZ1 eingebracht. Hierfür wurde ein Abschnitt der 23S rDNA gewählt, der in B_DKE und C_DKE gleich war, sich aber entscheidend von der 23S rDNA von A_DKE unterschied. Laut Metagenom-Analysen kommt die 23S rDNA nur einmal im Genom eines jeden Organismus der Ko-Kultur vor, sodass direkt von der Anzahl der 23S rDNA auf die Zellzahl geschlossen werden kann. Für die Klonierung wurden spezifische Primer abgeleitet, die Sequenzen aus den Organismen amplifiziert und diese dann über CRIM Klonierung in das

Genom von *E. coli* DH5alphaZ1 transformiert. Diese Mutante wurde nachfolgend für die Erstellung einer Eichgeraden genutzt.

Die Auswertung der qPCR Daten, ebenso wie die der CARD-FISH Bilder zeigte für die beiden *Thermoplasmatales* spp. und A_DKE ein ähnliches Wachstumsverhalten (Abb. 4-9). Die mit sechs Wochen relativ lange Lag-Phase war sowohl bei A_DKE, als auch bei B_DKE und C_DKE durch einen leichten Anstieg der Zellzahl gekennzeichnet, wobei die Anzahl an A_DKE Anfangs etwas höher lag. Nach der sechsten Woche scheinen alle Vertreter der Ko-Kultur in die exponentielle Phase eingetreten zu sein, wobei die Zellzahl bis Woche acht, in welcher die höchsten Zellzahlen gemessen wurden, stark anstieg. In dieser Zeit waren auch deutlich mehr B_DKE bzw. C_DKE Zellen, als A_DKE Zellen zu verzeichnen. Von diesem Punkt an fiel die Zahl der Organismen erst langsam und nach Woche neun rapide ab.

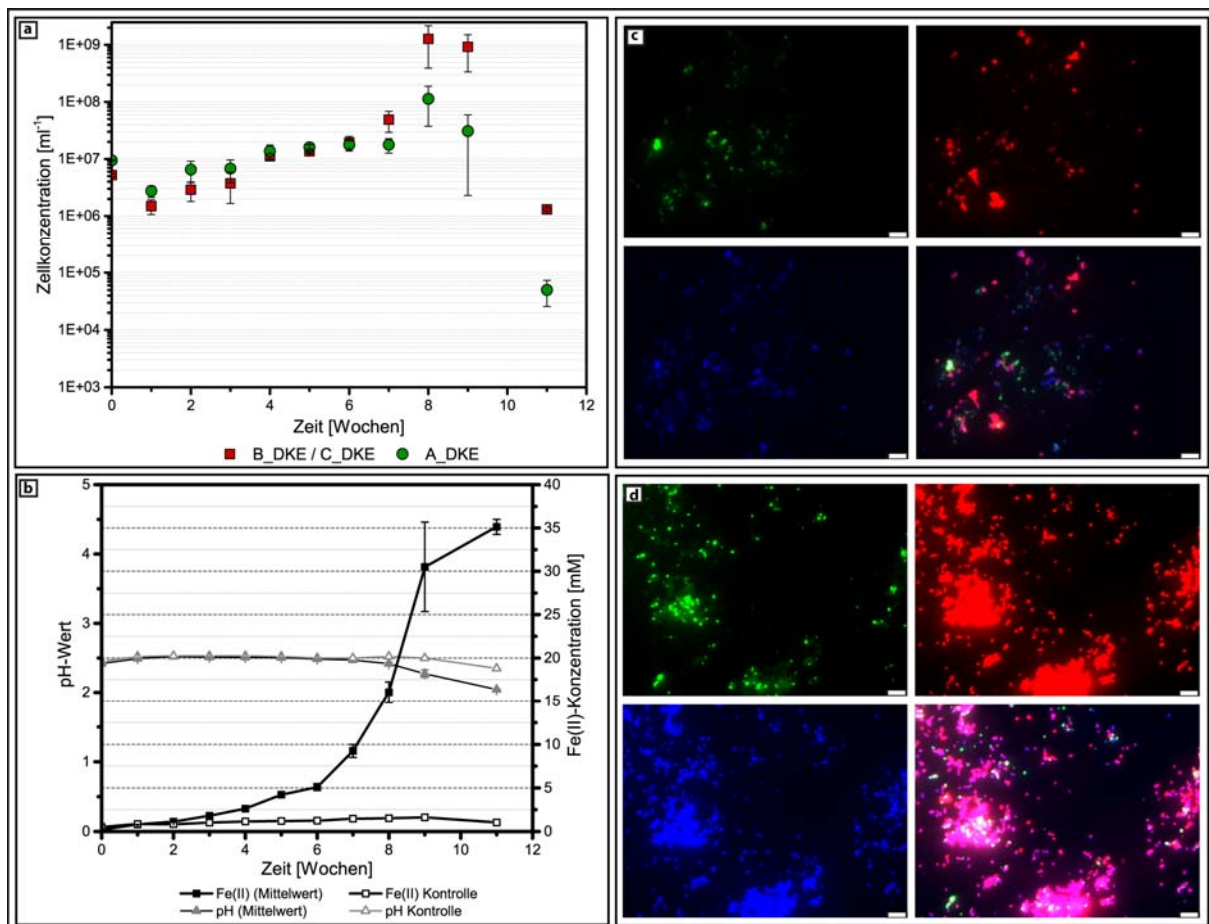


Abb. 4-9: (a) Zellkonzentrationen der Anreicherungskulturen basierend auf qPCR-Daten von A_DKE, B_DKE und C_DKE, (b) mit zugehörigen pH-Werten und Fe(II)-Konzentrationen über 11 Wochen. (c) Zugehörige CARD-FISH Bilder der Anreicherungskulturen nach (c) vier Wochen Inkubationszeit und (d) nach acht Wochen Inkubation. (In rot Archaea (ARCH915, Alexa 564) und in grün ARMAN (ARM980, Alexa 488). In blau die DAPI Gegenfärbung). (1000-fache Vergrößerung). Die Belichtungszeiten wurden wie in Kap. 3.5 beschrieben entsprechend angepasst.

Die Werte der Fe^{2+} -Konzentration im Medium korrelieren sehr gut mit den Daten der qPCR. Die Reduktion des im Medium enthaltenen Fe^{3+} verlief anfangs recht langsam, wobei ab Woche sechs ein deutlicher Anstieg der Fe^{3+} -Reduktionsrate zu verzeichnen war. Bis Woche neun waren dreiviertel des im Medium enthaltenen Fe^{3+} reduziert.

Der pH-Wert hingegen blieb über die gesamte Kultivierungsdauer konstant, wobei nur zum Eintritt der Zellen in die exponentielle Phase der pH-Wert leicht sank.

Im Vergleich der unterschiedlichen Anreicherungskulturen während der Kultivierungen war stets auffällig, dass ARMAN-verwandte Organismen per CARD-FISH ausschließlich in Kulturen zu detektieren waren, in denen die *Thermoplasmatales* in Aggregaten wuchsen (Abb. 4-10). Hier waren die ARMAN-Signale räumlich eng mit denen der *Thermoplasmatales* verbunden, sodass wenige einzeln wachsende ARMAN-Zellen sichtbar waren. Die Mehrheit bildete zusammen mit den *Thermoplasmatales* dichte Aggregate, in denen kaum Einzelzellen auszumachen waren. In Kulturen, in welchen die *Thermoplasmatales* als Einzelzellen wuchsen, konnten nie ARMAN-Signale festgestellt werden. Aggregatbildung ist aber kein eindeutiger Hinweis auf ARMAN-Wachstum. So gab es Kulturen, in denen die *Thermoplasmatales* recht dichte Aggregate bildeten, aber trotzdem kaum ARMAN-Signale auszumachen waren.

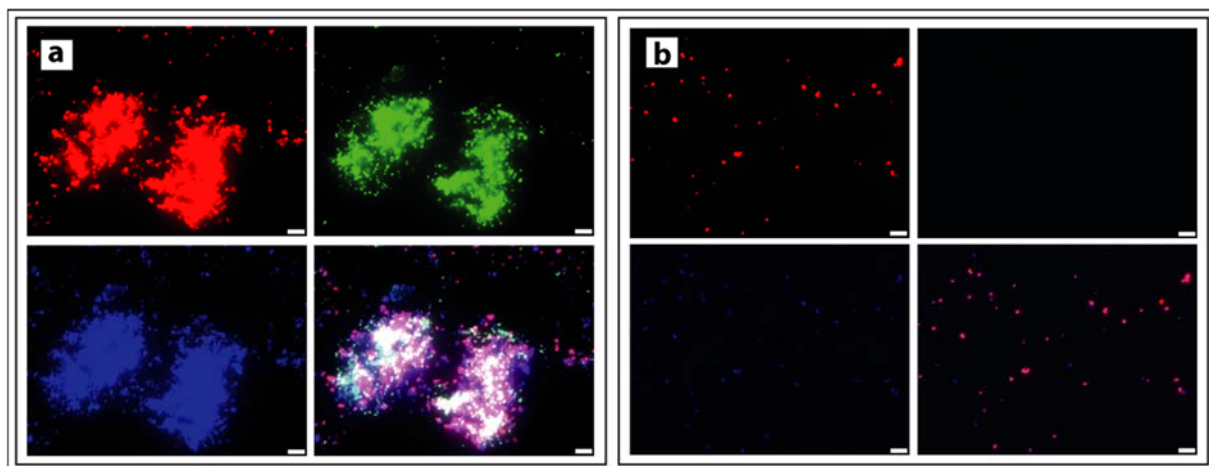


Abb. 4-10: CARD-FISH Bilder der Anreicherungskulturen. (a) Eine Kultur mit B_DKE, C_DKE und A_DKE in Aggregaten. (b) B_DKE Reinkultur, vorwiegend als Einzelzellen wachsend. (In rot Archaea (ARCH915, Alexa 564) und in grün ARMAN (ARM980, Alexa 488). In blau die DAPI Gegenfärbung). (1000-fache Vergrößerung). Die Größenbalken entsprechen in jedem Bild 10 μm . Die Belichtungszeiten wurden wie in Kap. 3.5 beschrieben entsprechend angepasst.

4.5 Anreicherungskulturen mit A_DKE und B_DKE

Interessanterweise führte das vollständige Weglassen der Antibiotika in den Anreicherungskulturen über den Verlauf der Arbeit dazu, dass C_DKE, welcher vorher schon unterrepräsentiert war, vollständig von den anderen Organismen der Ko-Kulturen verdrängt wurde. Nach einigen Überimpfungen ohne Antibiotika konnte C_DKE in keiner der Kulturen mehr über spezifische Primer per PCR nachgewiesen werden. Da bis zu diesem Zeitpunkt auch keine Hinweise auf methanogene Archaea in den Kulturen gefunden wurden, wurde fortan auf die Zugabe von H₂/CO₂ in die Gasphase der Hungates verzichtet.

4.5.1 Temperatur-Timeline mit A_DKE und B_DKE

Während des gesamten Zeitraums der Arbeit gab es immer wieder Zeitpunkte, in denen die Kulturen besser oder schlechter wuchsen und die ARMAN-verwandten Organismen kaum bis gar nicht detektierbar waren. Die Vermutung war, dass dieses Phänomen entweder Sauerstoffabhängig war, oder aber mit den leicht schwankenden Temperaturen im Labor zur Sommer- (Klimaanlage) und Winterzeit (Heizung) zusammenhing. Ein Eintrag von ca. 1 % Luftsauerstoff über sterilfiltrierte Raumluft in die fertig angeimpften Hungates zu Beginn der Kultivierung ließ keinerlei verändertes Wachstum der *Thermoplasmatales* und der ARMAN-verwandten Organismen erkennen. Eine Inkubation der Ko-Kulturen zu Beginn der Arbeit bei 30 °C oder 37 °C führte zu einem Absterben der Organismen und einem Ausfall des Mediums mit Farbumschlag von orange-braun zu dunkelbraun. In diesen Kulturen konnten per CARD-FISH keine aktiven Zellen mehr nachgewiesen werden. Da sich die phylogenetische Zusammensetzung der Kulturen über den Verlauf der Arbeit durch den Wegfall von C_DKE änderte und auch ein schnelleres Wachstum der verbliebenen Archaeen auszumachen war, wurde zum Ende der Arbeit eine weitere Kultivierung unter verschiedenen Temperaturen jeweils im Triplikate gestartet. Die Auswertung der wöchentlich gemessenen Fe²⁺-Konzentration als Referenz für das Wachstum innerhalb der Kulturen ist Abbildung Abb. 4-11 zu entnehmen.

Auffällig war, dass bei der Kultivierung ohne C_DKE keine der Kulturen einen Ausfall des Mediums oder dessen Verfärbung zeigte. Auch ist ein klarer temperaturbedingter Zusammenhang der Fe³⁺-Reduktionsrate zu erkennen. So zeigen Ko-Kulturen, welche bei 18 °C gewachsen waren, zusammen mit denen, die auf RT inkubiert wurden, die längste

Lag-Phase für die Fe^{3+} -Reduktion, wobei die bei RT inkubierten Kulturen ab Woche vier eine deutlich höhere Eisenreduktionsrate als die bei 18 °C inkubierten abbilden.

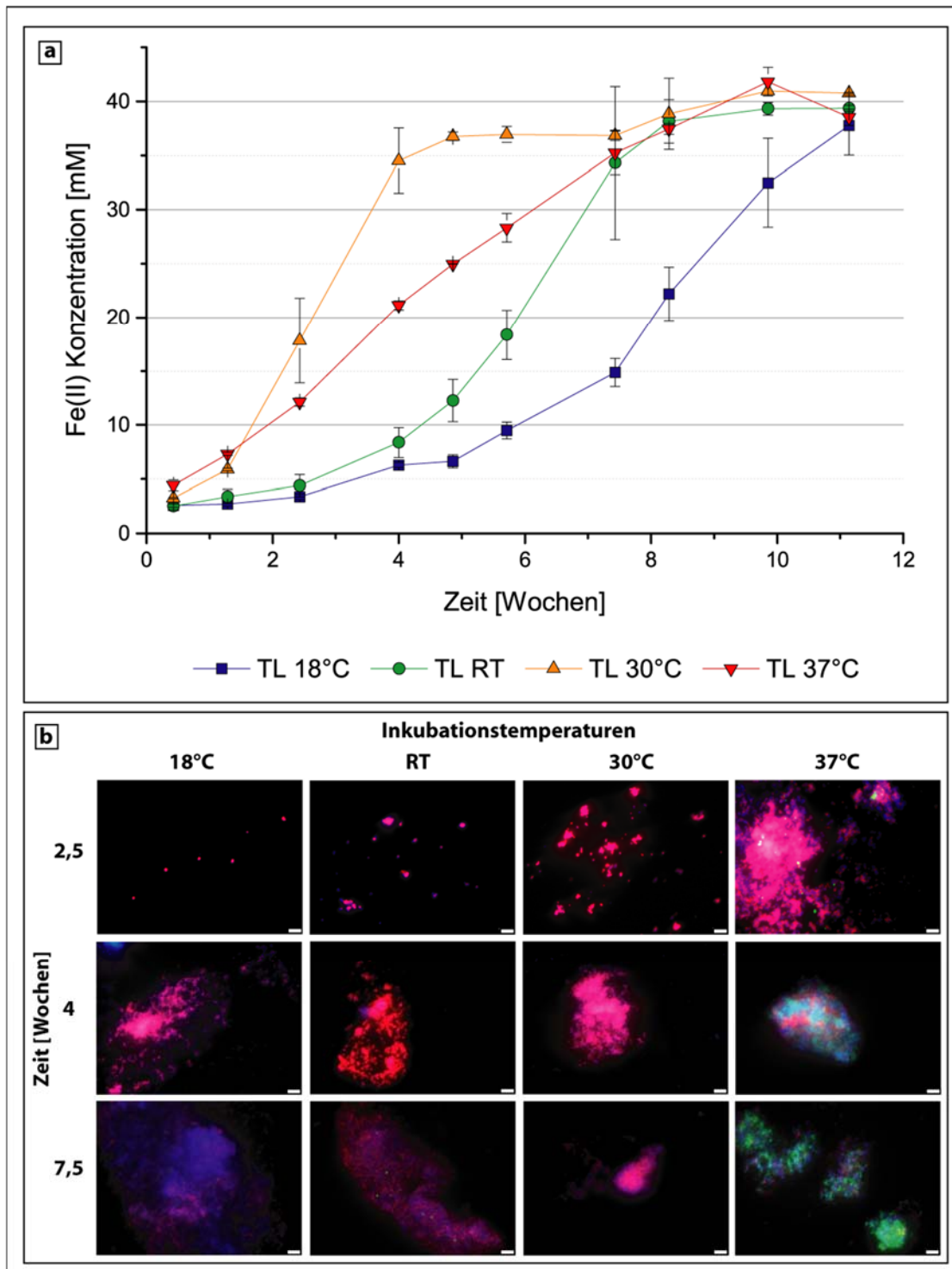


Abb. 4-11: (a) Timeline der Fe(II) -Konzentrationen der Anreicherungskulturen in Triplikaten, inkubiert mit unterschiedlichen Temperaturen (18 °C, RT, 30 °C und 37 °C). (b) Zugehörige CARD-FISH Bilder der Kulturen zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Inkubation. (Rot gefärbt Archaea (ARCH915, Alexa 564) und grün gefärbt ARMAN (ARM980, Alexa 488). In blau die DAPI Gegenfärbung). Der Größenbalken entspricht in jeder Abbildung 10 μm . Die Belichtungszeiten wurden wie in Kap. 3.5 beschrieben entsprechend angepasst.

Insgesamt ist die Eisenreduktion der bei RT gewachsenen Kulturen gut mit denen der Timeline aller drei Archaea (Kapitel 4.4) zu vergleichen. Allerdings ist bei diesem Experiment eine etwas kürzere Lag-Phase und eine früher eintretende stationäre Phase ab Woche acht erkennbar, als bei der mit C_DKE durchgeführten Timeline. Weiterhin wird deutlich, dass höhere Temperaturen eine höhere Eisenreduktionsrate bewirkten, wobei die kürzeste Lag-Phase, höchste Reduktionsrate und längste stationäre Phase bei den bei 30 °C inkubierten Kulturen auszumachen waren. Die bei 37 °C inkubierten Kulturen zeigten kaum eine Lag-Phase und eine sehr konstante Reduktionsrate über fast den gesamten Kultivierungszeitraum, bis nach Woche zehn die stationäre Phase erreicht wurde. Zugehörige CARD-FISH Bilder unterstreichen diese Ergebnisse (Abb. 4-11 (b)). So ist bei den bei RT und bei 18 °C gewachsenen Kulturen bis Woche vier eine wöchentlich steigende Zelldichte für mit Archaea-Sonden gefärbte Organismen auszumachen. Mit ARMAN-Sonden gefärbte Zellen waren stets extrem selten zu finden, wobei gegen Ende der Kultivierung mehr Organismen detektiert werden konnten. Auch die frühe stationäre Phase der bei 30 °C inkubierten Kulturen spiegelt sich in den CARD-FISH Bildern mit einer abnehmenden Zellzahl der mit der Archaea-Sonde gefärbten Organismen ab Woche vier wieder. Nach 7,5 Wochen Inkubation scheint die Zellzahl wieder etwas zuzunehmen und auch in der Eisenreduktion ist ab diesem Zeitpunkt nochmals eine leichte Zunahme erkennbar. Auch hier waren mit ARMAN-Sonden gefärbte Organismen sehr wenig vertreten, wobei die Zellzahl gegen Ende der Kultivierung etwas zunahm. Überraschend war das CARD-FISH Ergebnis der bei 37 °C inkubierten Kulturen. Bis Woche vier scheint die Zellzahl der Arch915 gefärbten Organismen zugenommen zu haben, wobei nach diesem Zeitpunkt die Anzahl aktiver Zellen eher abzunehmen schien und nachfolgend schwankte. Gleichzeitig konnte ab Woche vier eine vergleichsweise sehr hohe Anzahl an ARM980 gefärbten Organismen ausgemacht werden. Die Anzahl der aktiven ARMAN-verwandten Archaeen war im Verlauf ähnlich hoch wie die der Arch915 gefärbten und überstieg diese teilweise sogar. Nach acht Wochen Inkubationszeit war ein Abfall der Zellzahlen beider Organismen auszumachen.

4.5.2 Einfluss des Pilzes auf das Wachstum von A_DKE und B_DKE

Die Frage, ob der in den Ko-Kulturen vorkommende Pilz einen Einfluss auf das Wachstum der Archaea durch etwaige Stoffwechselendprodukte, welche als Wachstumsfaktoren dienen könnten, hat, sollte mit einem Überstandsexperiment geklärt werden. Der isolierte Pilz (siehe Kap. 4.6.1) wurde hierfür in *Picrophilus*-Medium angeimpft und für 5,5 Wochen in diesem wachsen gelassen. Danach wurde eine der vorbeimpften Kulturen autoklaviert und eine andere über zwei Spritzenvorsatzfilter (0,2 µm und 0,1 µm) sterilfiltriert, um sicher zu gehen, dass kein zusätzlicher Pilz in die Kulturen überführt wurde. Je 4,5 ml des filtrierten und des autoklavierten Überstands wurden in ein Hungate mit 4,5 ml frischem *Picrophilus*-Medium überführt, anaerobisiert und anschließend beimpft. Eine Kultur angesetzt mit ausschließlich frischem *Picrophilus*-Medium sollte als Kontrolle dienen (Abb. 4-12).

Auffällig war, dass die Kulturen mit Überstand bei einem weitaus höheren Fe^{2+} -Wert starteten, als die Kontrolle. Unabhängig davon lässt sich ein Unterschied in der Eisenreduktionsrate ausmachen. Vergleicht man die Steigung der Kurven, so wird deutlich, dass die Kurve, welche die Kultur mit autoklaviertem Überstand repräsentiert, einen ähnlichen Steigungswinkel darstellt, wie die der Kontrolle. Die Kultur mit filtriertem Pilzüberstand hingegen zeigt einen deutlich steileren Neigungswinkel und erreichte bereits in Woche sechs die stationäre Phase. Dies repräsentieren auch die CARD-FISH Bilder, welche eine anfänglich höhere Zelldichte der mit Arch915 gefärbten Zellen für die Kultur mit filtriertem Pilzüberstand zeigen, als mit autoklaviertem Überstand. Ab Woche sechs ist ein deutlicher Abfall der Zellzahlen für die mit filtriertem Überstand enthaltene Kultur auszumachen. Die Zellzahl der Kultur mit autoklaviertem Überstand scheint bis Woche acht anzusteigen und danach in die stationäre Phase zu kommen. Die Kontrolle zeigt eine beständig ansteigende Zellzahl bis zum Ende der Kultivierungsdauer. Die Anzahl der mit Arm980 gefärbten Zellen ist in allen Kulturen über den gesamten Kultivierungszeitraum sehr gering, wobei die Kultur mit filtriertem Überstand zwischen Woche vier und sechs und die anderen Kulturen zwischen Woche sechs und zehn leicht erhöhte Zellzahlen aufwiesen.

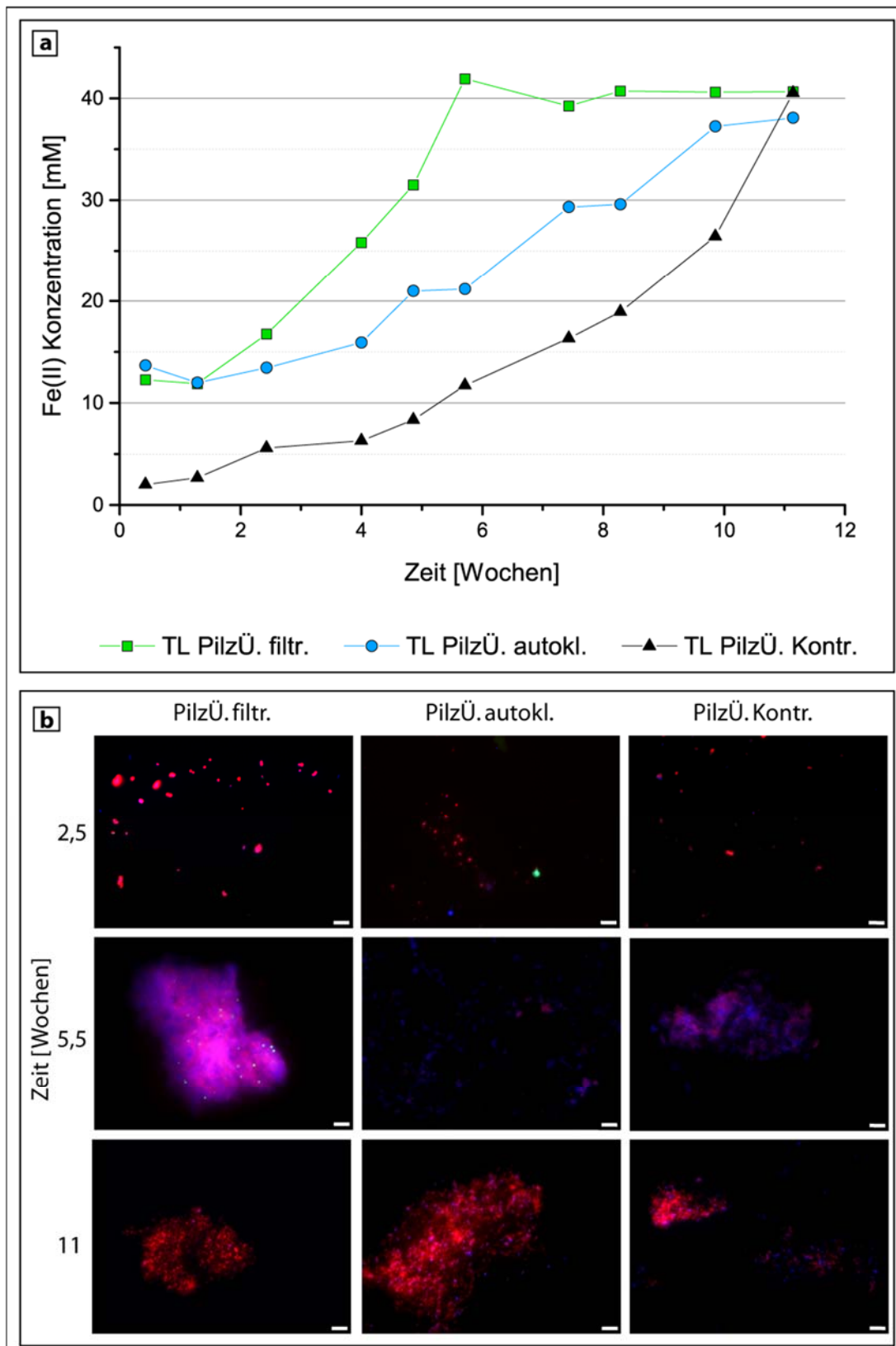


Abb. 4-12: (a) Timeline der Fe(II)-Konzentrationen der Anreicherungskulturen, angeimpft mit filtriertem Pilzüberstand, autoklaviertem Pilzüberstand und einer Kontrolle mit normalem *Picrophilus*-Medium. (b) Zugehörige CARD-FISH Bilder der Kulturen zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Inkubation. Rot gefärbt Archaea (ARCH915, Alexa 564) und grün gefärbt ARMAN (ARM980, Alexa 488). In blau die DAPI Gegenfärbung. Die Größenbalken entsprechen in jedem Bild 10 μm . Die Belichtungszeiten wurden wie in Kap. 3.5 beschrieben entsprechend angepasst.

4.6 Isolierungsstrategien

Im Laufe dieser Arbeit wurden unterschiedliche Isolierungsstrategien für die *Thermoplasmatales* und den ARMAN-verwandten Organismus getestet. Die Isolierung des in den Kulturen dominanten Vertreters B_DKE über Verdünnungsreihen hat in keinem der Fälle funktioniert. Die Kulturen wuchsen nach einer 100-fachen Verdünnung und höher auch nach mehreren Monaten der Inkubation nicht mehr an.

Da acidophile Organismen oftmals sensitiv gegenüber organischen Substanzen sind, wurde statt Agar für die Isolierungsversuche über verfestigte Medien Agarose, Gelrite, Stärke (nach Smithies) oder PhytaGel als Verfestigungsmittel gewählt (Kapitel 3.1.4). Auch nach Monaten der Inkubation führte diese Methode ebenfalls nicht zum Erfolg.

Eine Kultivierung der Ko-Kulturen in Picophilus-Medium mit pH 1,0 führte zu Kulturen, in denen per CARD-FISH ausschließlich *Thermoplasmatales*, aber keine ARMAN mehr nachgewiesen werden konnten. Nach vier Überimpfungen konnte ebenfalls per PCR mithilfe spezifischer Primer keine B_DKE 23S rDNA mehr nachgewiesen werden. Lediglich Ansätze mit komplementären Primern zur 23S rDNA von C_DKE ergaben ein positives Ergebnis. Leider konnten diese Kulturen nach weiteren zwei Überimpfungen nicht am Leben erhalten werden. Aus bisher unbekanntem Gründen wuchsen die Kulturen nach mehreren Überimpfungen immer schlechter, bis keine aktiven Zellen mehr per CARD-FISH nachweisbar waren.

Das Zufügen unterschiedlicher Antimykotika als Strategie gegen den in den Kulturen vorkommenden Pilz führte nicht zum gewünschten Erfolg. Versuche mit Reinkulturen des Pilzes in Medien, welchen die in Tabelle 3-6 beschriebenen Fungizide zugesetzt wurden, zeigten in keinem der Fälle eine vollständige Verdrängung des Pilzes. In manchen Fällen konnte allerdings ein reduziertes Wachstum festgestellt werden, was jedoch auch nach Erhöhung der Antimykotika-Konzentrationen lediglich zu reduziertem Wachstum des Pilzes führte und nie zu einer vollständigen Unterdrückung.

Da die Zugabe von Fungiziden nicht zur vollständigen Verdrängung von *Acidothrix acidophila* führte, war ein weiterer Ansatz die Filtration der Anreicherungskulturen über Spritzenvorsatzfilter unterschiedlicher Porengrößen. Dies sollte dazu dienen den Pilz von den kleineren Archaea zu trennen. Außerdem sollte A_DKE, welcher kleiner als B_DKE und C_DKE ist, angereichert oder gar isoliert werden. Die Filtration mit 0,1 µm Filtern führte selbst nach

vielen Wochen Inkubationszeit zu keinem erkennbaren Wachstum. Auch die Kulturen, welche mit 0,2 µm und 0,45 µm Filtern filtriert wurden, wuchsen sehr langsam, wobei bei den Kulturen mit 0,2 µm Filtern kaum Wachstum erkennbar war. Diese Kulturen erreichten auch nach längerer Inkubationszeit nie eine große Zelldichte. Es waren bestenfalls sehr vereinzelt Zellen per CARD-FISH Analyse zu beobachten. Kulturen, welche mit 0,45 µm Filtern filtriert wurden, brauchten doppelt bis dreifach so lang wie normal angesetzte Kulturen, bis dichtes Wachstum der Archaea erkennbar war. Interessanterweise wuchs bei fast allen Kulturen, welche mit 0,2 µm und 0,45 µm Filtern filtriert wurden der Pilz wieder an.

4.6.1 Isolation von *Acidothrix acidophila*

Die Isolation des in den Anreicherungskulturen vorkommenden Pilzes gelang mithilfe eines verfestigten Mediums (Kapitel 3.1.3). Kolonien dieses Pilzes wurden für die phylogenetische Analyse mittels ITS-Primern genutzt. Ein Abgleich der 5,8S rDNA Sequenz und der benachbarten ITS-Region mit der Datenbank des National Center for Biotechnology Information (NCBI) ergab eine 99 %-ige Übereinstimmung der Sequenz mit *Acidothrix acidophila*, einem acidophilen Pilz, welcher 2016 aus sauren Böden in der Tschechischen Republik isoliert wurde (Hujšlová *et al.*, 2014). Bei der Kultivierung des Pilzes im Medium der Anreicherungskulturen konnte keine Fe³⁺-Reduktion festgestellt werden.

4.6.2 Isolation von B_DKE

Das Weglassen der Antibiotika führte nicht nur zur Verdrängung von C_DKE, ebenso setzte sich in manchen Kulturen B_DKE vollständig durch, sodass auch A_DKE nach einigen Überimpfungen weder per PCR noch über CARD-FISH in diesen nachgewiesen werden konnte. Dies traf aber niemals auf alle Kulturen zu.

Bei einer dieser Kulturen, welche nur noch B_DKE und Pilz enthielt, gelang nach einer Filtration durch einen 0,45 µm Filter die Elimination des Pilzes aus der Kultur. Diese Kultur brauchte fünf Monate der Inkubation bis eine Trübung der Kultur und somit ein dichtes Wachstum von B_DKE erkennbar war. Eine PCR auf die 16S rDNA der anderen Vertreter der Anreicherungskultur blieb negativ und auch nach zwei Überimpfungen konnten weder Pilzhyphen in den Kulturen noch unter dem Mikroskop nachgewiesen werden. Wie in

Kapitel 4.2 bereits erwähnt, sind nächstverwandte Arten zu B_DKE *Thermogymnomonas acidicola* (91,6 % identity, 1206 bp) und *Cuniculiplasma divulgatum* (91,6 % identity, 1206 bp). Sequenzen, welche eine höhere Übereinstimmung mit der 16S rDNA von B_DKE zeigen, stammen alle aus Metagenomanalysen von Umweltproben, wobei bisher kein kultivierter Vertreter bekannt ist. Tabelle 4-5 zeigt eine Übersicht über die nächstverwandten Organismen.

Tab. 4-5: Nächstverwandte Organismen zur 16S rDNA Sequenz von B_DKE.

Organismus	Query coverage	E-Wert	Identity	Fundort	NCBI Accession Nummer
Uncultured <i>Thermoplasma</i> sp. clone JL62	99 %	0.0	99 %	Rio Tinto, Spanien	HQ730609.1
Uncultured <i>Thermoplasmatales</i> archaeon clone ORCL3.3	99 %	0.0	99 %	Huelva, Spanien	EF396244
Uncultured archaeon clone 20m_arch_h3	99 %	0.0	99 %	Iberischer Pyritgürtel, Spanien	HM745409
Uncultured <i>Thermoplasmatales</i> archaeon clone S4BAC1	99 %	0.0	99 %	Cae Coch, Wales	GU229859
Uncultured archaeon clone AG_Eug_f6	99 %	0.0	99 %	Rio Tinto, Spanien	EU370310
Uncultured archaeon clone CEM_Pin_c1a	99 %	0.0	99 %	Rio Tinto, Spanien	EU370309
Uncultured archaeon clone LMi-biof-arch_d6	99 %	0.0	99 %	Copahue, Neuquen, Argentinien	KP204537

Erste Kultivierungsversuche mit B_DKE zeigen, dass dieser in der Lage ist, das komplette im Medium enthaltene Fe(III) zu reduzieren.

4.7 Ausblick - Alternative Kultivierungstechniken

Da die Isolierung von A_DKE und die Trennung des Pilzes von der Ko-Kultur mit klassischen Isolierungsmethoden nicht erfolgreich war, wurde als weitere Strategie die Kultivierung in einer mikrofluidischen Fließzelle gewählt. Diese Fließzellen wurden von und in Kooperation mit Silla Hansen vom Institut für Biologische Grenzflächen I (IBG I) des KIT designt und hergestellt. Ebenfalls wurde die von Tobias Kabbeck vom Institut für Angewandte Biowissenschaften am KIT in Zusammenarbeit mit Silla Hansen entwickelte Kultivierungsplattform genutzt. So wurden die Silikonfließzellen nach dem Autoklavieren mit dem für die Medienversorgung wichtigen Schlauchsystem verbunden. Trotz der Kultivierung

in einem Anaerobenzelt waren die Fließzellen in die in Kapitel 2.2.2 beschriebenen Kammern gebettet, da Silikon sowohl Gas- als auch Wasserdampfdurchlässig ist und durch die extrem niedrige Fließgeschwindigkeit von 2 $\mu\text{l}/\text{min}$ die Fließzellen nach mehreren Tagen Inkubationszeit ausgetrocknet wären. Nach zweitägiger Inokulation mit gut gewachsenen Anreicherungskulturen wurden die Fließzellen für mehrere Wochen inkubiert. Nach elf Wochen Inkubation wurden zwei Fließzellen fixiert und wie in Kapitel 3.2.11 beschrieben mittels CARD-FISH spezifisch auf Archaea und ARMAN-verwandte Organismen gefärbt.

In beiden Fließzellen konnte eine leichte Biofilmbildung nachgewiesen werden, wobei die Fließzellen im vorderen und hinteren Bereich stärker bewachsen waren. Laut CARD-FISH Analyse bestand der Biofilm ausschließlich aus *Thermoplasmatales*, wobei in den hinteren Bereichen zusätzlich einzelne ARMAN-verwandte Organismen auszumachen waren (Abb. 4-13). Eine Schwierigkeit bei der Analyse bestand jedoch darin, dass auf der Silikonseite der Fließzellen eine stärkere Biofilmbildung zu beobachten war, als auf der Deckglasseite. Die Silikonseite konnte indes nur mit einer 100-fachen Vergrößerung mikroskopiert werden, was den Nachweis einzelner Zellen quasi unmöglich machte. Interessanterweise konnte in beiden analysierten Fließzellen kein Pilzwachstum nachgewiesen werden. Auch in den Sammelgefäßen, in denen sich der Durchfluss und mit ihm abgetragene Organismen sammelten, konnte kein Pilzwachstum beobachtet werden.

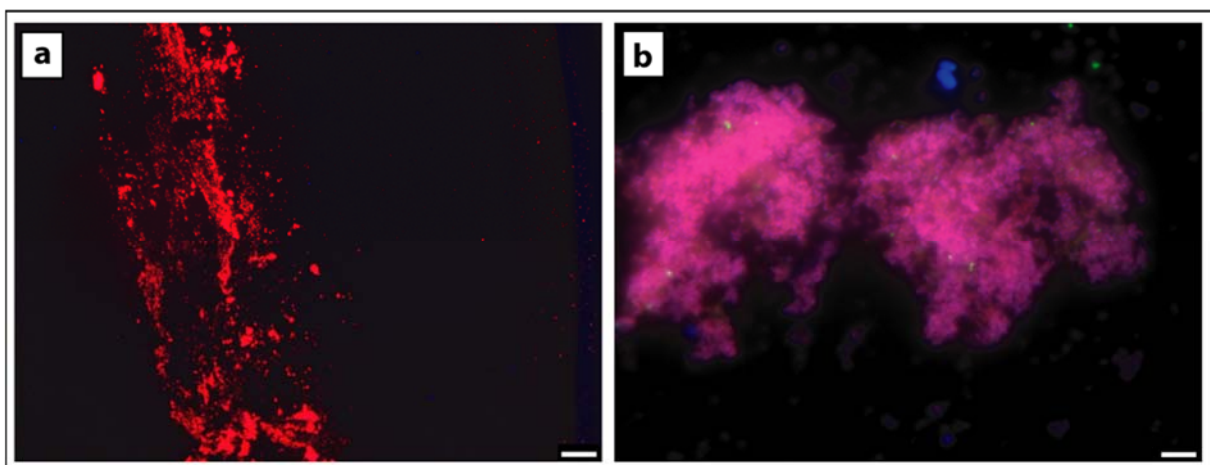


Abb. 4-13: CARD-FISH Bilder aus dem hinteren Bereich einer Fließzelle nach 11 Wochen Inkubationszeit. (a) 100-fache Vergrößerung der Silikonseite. (b) 1000-fache Vergrößerung der Deckglasseite. (Rot gefärbt Archaea (ARCH915, Alexa 564) und grün gefärbt ARMAN (ARM980, Alexa 488). In blau die DAPI Gegenfärbung). Der Größenbalken entspricht im linken Bild 100 μm und im rechten Bild 10 μm . Die Belichtungszeiten wurden wie in Kap. 3.5 beschrieben entsprechend angepasst.

Da die Fließzellen nach elf Wochen noch nicht sehr dicht bewachsen waren und eher einzelne Abschnitte eine leichte Biofilmbildung aufwiesen, wurden die verbliebenen Fließzellen weitere vier Wochen inkubiert, bevor eine weitere fixiert und mittels CARD-FISH analysiert wurde. Hier konnte ein dichteres Wachstum der Archaea in den hinteren Bereichen der Fließzelle beobachtet werden, wobei auch hier wieder die dichteste Biofilmbildung auf der Silikonseite zu beobachten war (Abb. 4-14). Auf der Deckglasseite waren eher kleinere Biofilmaggregate wie in Abb. 4-13 (b) zu erkennen. Aber auch die Randbereiche des Kanals waren nach 15 Wochen Inkubationszeit mit einem fast durchgängigen, aber noch dünnen Biofilm bewachsen (Abb. 4-14 (b)). Nach diesen insgesamt 15 Wochen Inkubationszeit konnte weder in den Fließzellen, noch in den Sammelbehältern des Durchflusses der Pilz nachgewiesen werden. Das Wachstum der ARMAN-verwandten Organismen war auch nach dieser Zeit immernoch recht vereinzelt.

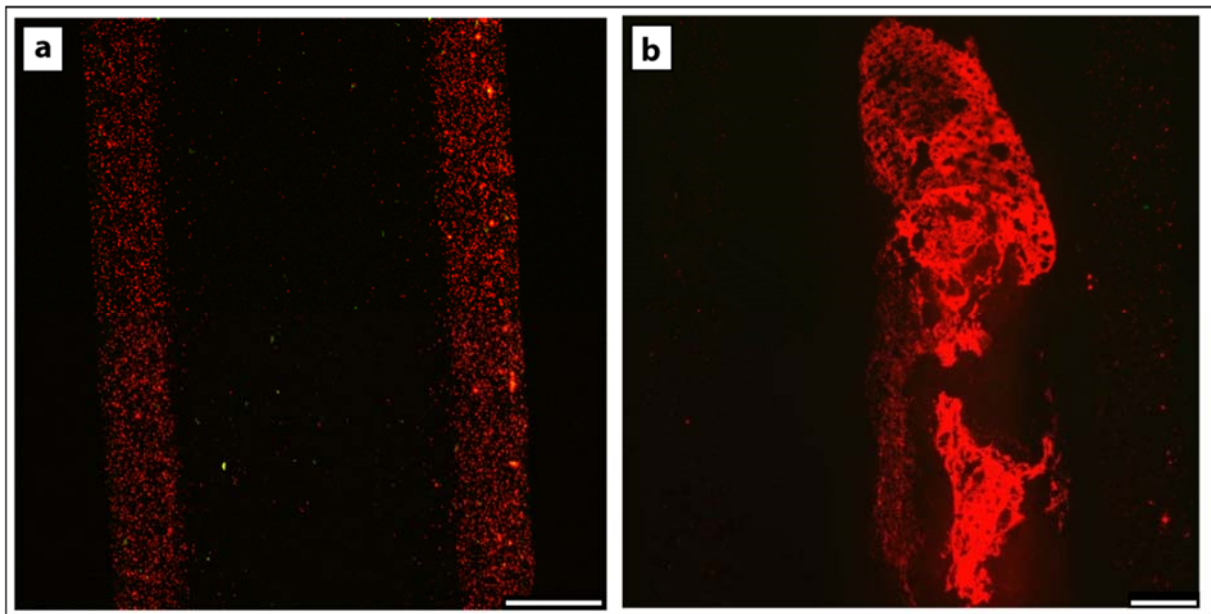


Abb. 4-14: CARD-FISH Bilder einer Fließzelle nach 15 Wochen Inkubationszeit. (a) Konfokalmikroskopische Aufnahme (100-fache Vergrößerung) der Deckglasseite. (b) Aufnahme der Silikonseite, ebenfalls 100-fache Vergrößerung. (Rot gefärbt Archaea (ARCH915, Alexa 564) und grün gefärbt ARMAN (ARM980, Alexa 488). In blau die DAPI Gegenfärbung). Die Größenbalken entsprechen in beiden Bildern 250 μm .

5 Diskussion

Ehemalige Bergbaugebiete und insbesondere Pyritminen stellen enorme Herausforderungen an den Umweltschutz. So bilden sich durch Sauerstoffeintrag und Auswaschung der Gesteinsschichten saure Grubenwässer, welche die Umgebung weiträumig ansäuern und gelöste Schwermetalle in die Umwelt eintragen. Dieser Prozess wird durch mikrobielle Aktivität bis zu 1×10^6 -fach verstärkt (Singer und Stumm, 1970). Der Großteil vergangener Forschungsarbeiten hatte bisher die Bacteria im Fokus, welche in AMD-Gebieten reichlich zu finden sind und die dominanten Primärproduzenten acidophiler Konsortien dieser Gebiete darstellen. In den letzten Jahren wurden aber auch mikrobielle Konsortien mit einer sehr hohen Anzahl an Archaea gefunden, welche teilweise weder charakterisiert noch isoliert sind. In diesem Zusammenhang ist vor allem die Gattung der *Thermoplasmatales* zu nennen, welche den Großteil der Archaea in den analysierten Konsortien ausmacht (Baker und Banfield, 2003). Aber auch bisher unkultivierte ultrakleine Archaea, die sogenannten ARMAN (Archaeal Richmond Mine Acidophilic Nanoorganisms), wurden erstmals in acidophilen Biofilmen des AMD-belasteten Gebiets der Iron Mountains in Kalifornien gefunden (Baker *et al.*, 2006). Von diesen ultrakleinen Archaea sind bisher 5 verschiedene Gruppen bekannt. Jedoch existierten von ihnen bisher ausschließlich elektronenmikroskopische und fluoreszenzmikroskopische Bilder und darüber hinaus Metagenomauswertungen von ARMAN-2, 4- und -5. Aus diesen Daten wurde postuliert, dass sie aerob leben, wobei der Zentralstoffwechsel, ebenso wie die Frage nach einer potentiellen Abhängigkeit von anderen Mitgliedern der Konsortien, wie sie für *N. equitans* und *N. acidilobi* beschrieben sind, bisher weitgehend ungeklärt blieben. Für genauere Analysen des Wachstumsverhaltens und möglicher Interaktionen mit anderen Mikroorganismen sind Kultivierungsversuche im Labor unbedingt notwendig.

In dieser Arbeit wurde ein Konsortium aus acidophilen Archaea angereichert, sowohl physiologisch als auch bioinformatisch charakterisiert und einzelne Organismen der Kulturen isoliert. Abb. 5-1 zeigt ein Schema über die grobe zeitliche Reihenfolge der wichtigsten Ereignisse.

Start	454 Sequenzierung	DNA-Isolation für Metagenom	RNA-Isolation für Metatranskriptom	C_DKE isoliert (Kulturen nicht mehr vorhanden)	Timeline A_DKE, B_DKE und C_DKE	Kein C_DKE mehr in Ko-Kulture nachweisbar	<i>Acidothrix</i> sp. isoliert	Timelines mit A_DKE und B_DKE gestartet	Fließzellen angesetzt	B_DKE isoliert
07/2013	09/2013	08/2014	12/2014	08/2015	09/2015	04/2016	07/2016	11/2016	12/2016	01/2017

Abb. 5-1: Zeitliche Reihenfolge der wichtigsten Ereignisse im Verlauf dieser Arbeit.

Die Anreicherung der in den Ko-Kulturen vorkommenden Archaea wurde zu Beginn dieser Arbeit über eine 454-Sequenzierung verifiziert. Eine Analyse dieser Sequenzierung ergab sowohl für das Amplifikat der universellen Bacteria Primer, als auch für die universellen Archaea Primer mit über 95 % eine deutliche Dominanz an 16S rDNA Sequenzen, welche nach einem Abgleich mit der Datenbank des RDP Classifiers den *Thermoplasmatales* zuzuordnen sind. Bei den universellen Archaea Primern waren sogar 99,9 % aller 16S rDNA Sequenzen den *Thermoplasmatales* zugehörig. Ein erneuter Abgleich einzelner Beispielsequenzen mit der aktuellen NCBI-Datenbank ergab für 0,1 % der Sequenzen, welche mit Bacteria-Primern amplifiziert wurden und 0,9 % der Sequenzen mit Archaea-Primern eine 100 %-ige Übereinstimmung zu *Cuniculiplasma divulgatum*, welcher zum Zeitpunkt der 454-Analyse noch nicht isoliert war. Der Rest der den *Thermoplasmatales* zugehörigen Sequenzen ergab eine 97 %-ige Identität (E-Wert 5e-118, Coverage 77 %) ebenfalls zu *Cuniculiplasma divulgatum*. Diese Ergebnisse sind jedoch aufgrund der Kürze der Amplifikate von rund 300 bp nicht sehr aussagekräftig, da mit solch kurzen Sequenzen keine genauere Aussage über eine direkte Verwandtschaft geschlossen werden kann. Bemerkenswert ist die Amplifikation von Sequenzen zugehörig zu den „Micrarchaeles“ durch Verwendung der Bacteria Primer. Der geringe Prozentsatz kann auf eine ungenügende Passfähigkeit der Primer zu den Micrarchaeles-Sequenzen zurückgeführt werden, welche bis zu drei Mismatches zeigten. Auch Baker *et al.* (2006) berichteten von einem Mismatch von 3-5 Basen der ARMAN-16S rDNA Sequenzen zu allgemein genutzten universellen Primern.

CARD-FISH Bilder bestätigten die Präsenz von Archaeen und auch ARMAN-verwandten Organismen in den Kulturen, wobei keine Bacteria mehr detektiert werden konnten. Desweiteren einhielten die Kulturen laut CRAD-FISH Analysen einen zu diesem Zeitpunkt nicht näher bestimmten Pilz.

5.1 Analyse der Zusammensetzung der Ko-Kulturen

Nachdem die Kulturen nach ca. 2,5 Jahren ein recht stabiles Wachstumsverhalten zeigten, wurde DNA für die Erstellung eines Metagenoms isoliert, um einen tieferen Einblick in die Zusammensetzung und den Aufbau der Ko-Kulturen zu erhalten. So konnten aus insgesamt 26,5 Gbp Sequenzierungsdaten zweier biologischer Replikate drei unterschiedliche Genome rekonstruiert werden.

Eine taxonomische Auswertung der einzelnen Contigs über Taxator-tk unterstreicht die Ergebnisse der vorangegangenen 454-Sequenzierung. So konnten mit über 80 % die Mehrheit der Sequenzen den Archaea zugeordnet werden. Eine Zuordnung der übrigen Sequenzen war nicht möglich. 57 % bzw. 29 % der Sequenzen konnten sogar bis zu Ordnung der *Thermoplasmatales* zurückgeführt werden. Die übrigen Sequenzen gehörten entweder den Euryarchaeota an, zu denen auch die *Thermoplasmatales* gezählt werden, oder konnten nur bis zur Domäne der Archaea taxonomisch eingeordnet werden. Dies kann darauf zurückgeführt werden, dass ARMAN-zugehörige Sequenzen nur bis zur Domäne der Archaea zuverlässig über die Taxator-tk Software eingeordnet werden konnten, da in den öffentlichen Datenbanken bisher zu wenige Referenzgenome hinterlegt sind. Dass keine dem Pilz *Acidothrix acidophila* zuzuordnenden Sequenzen im Metagenom detektiert wurden, kann auf ein sehr geringes Wachstum des Pilzes während der DNA Isolierung zurückzuführen sein. Möglicherweise war auch das DNA-Isolationsprotokoll für den Aufschluss der Pilz-Zellen ungeeignet.

Die den Genomen zugehörigen 16S rDNA Sequenzen konnten mit den vorangegangenen Analysen übereinstimmend drei unterschiedlichen Archaea zugeordnet werden. Ein Organismus, bezeichnet als A_DKE, zeigte mit einer 99 %-igen Übereinstimmung der 16S rDNA Sequenz eine nahe Verwandtschaft zu ARMAN-1. Die Gruppe der ARMAN wurde 2006 von Baker *et al.* das erste mal in der Richmond Mine des Iron Mountain in Kalifornien entdeckt. Zwar ist diese Mine ebenfalls eine ehemalige Pyritmine mit entstehendem AMD

wie in Drei Kronen und Ehrt (DK&E), jedoch herrschen dort extremere Bedingungen als in der Mine im Harz, aus der die hier untersuchten Anreicherungskulturen stammen. So sind die Temperaturen der Richmond Mine mit 30 °C bis 59 °C deutlich höher als die Temperaturen in DK&E, in welcher nur 13 °C bis 16 °C gemessen wurden (Druschel *et al.*, 2004; Ziegler, 2013). Des Weiteren sind die Minenwässer der Richmond Mine mit einem pH-Wert von 0,5-1,5 deutlich saurer als die in DK&E, wo die Wässer, welche die dort vorkommenden Biofilme durchfließen, einen pH-Wert von ~2,5 aufweisen. Beide Standorte bilden jedoch einen Lebensraum für ARMAN-verwandte Organismen. Ein zweiter detektierter Organismus ist nächstverwandt zu *Thermogymnomonas acidicola* und *Cuniculiplasma divulgatum*, hier bezeichnet als B_DKE. Mit knappen 92 % Übereinstimmung der 16S rDNA Sequenzen stellt daher B_DKE eine neue Gattung innerhalb der Familie der *Thermoplasmataceae* dar (Yarza *et al.*, 2014). Seine nächsten Verwandten wurden im Falle von *C. divulgatum* aus kupfererzhaltigen sulfidischen Lagerstätten in Nord Wales und Süd-West Spanien isoliert. Die Wachstumsbedingungen an diesen Orten liegen bei Temperaturen zwischen 10 °C und 48 °C und einem pH-Wert von 0,5 bis 4,0, was den Konditionen der DK&E-Mine und den Wachstumsbedingungen der Anreicherungskulturen entspricht. *T. acidicola* hingegen wächst bei Temperaturen von 38 °C bis 68 °C. Dies entspricht einer deutlich höheren als der in DK&E vorherrschenden Temperatur.

Vergleicht man die Anzahl der gemappten Reads der einzelnen Genome miteinander, so stellen A_DKE und B_DKE mit Abstand die dominanten Vertreter der Ko-Kulturen dar. Die unterschiedliche Verteilung innerhalb der Replikate kann darauf zurückzuführen sein, dass sich die Kulturen, obwohl gleich behandelt in unterschiedlichen Wachstumsstadien befanden. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass die Kulturen der beiden Replikate aus unterschiedlichen Ausgangskulturen inokuliert wurden.

Die 16S rDNA Sequenz des letzten und mit 1,5 % bzw. 8,1 % Anteil an der Gesamtheit der Reads deutlich unterrepräsentierten Genoms, wies eine 100 %-ige Übereinstimmung mit *C. divulgatum* auf, hier als C_DKE bezeichnet.

5.2 Analyse des Metagenoms

Mit ca. 1 Mbp hat A_DKE das kleinste Genom der in den Anreicherungskulturen vorkommenden Organismen und ist damit ebenso groß wie die bisher veröffentlichten Genome von ARMAN-2, -4 und -5 (Baker *et al.*, 2010). Die publizierte Vollständigkeit dieser Genome ist mit bis zu 99 % deutlich höher, als die des hier rekonstruierten Genoms, welches eine Vollständigkeit von knapp 82 % aufweist. Jedoch wurde die Vollständigkeit dieser Genome mit einer älteren Methode berechnet, welche die Existenz von 40 festgelegten Markergenen prüft (Raes *et al.*, 2007). Die Vollständigkeit der hier analysierten Genome wurde über CheckM berechnet, welches weitaus mehr und spezifischere Markergene nutzt, abhängig von der Position eines Genoms innerhalb eines Referenz-Stammbaumes (hier 150 für ARMAN bzw. 188 für B_DKE und C_DKE) (Parks *et al.*, 2015). Analysiert man die verfügbaren Genome von ARMAN-2, -4 und -5 mit CheckM auf ihre Vollständigkeit, so erhält man ebenfalls weitaus geringere Werte mit 84,3 %, 68,4 % und 77 %. Da die ARMAN phylogenetisch sehr weit von bisher bekannten Archaeen clustern, ist dieser niedrige Prozentsatz der Vollständigkeit wahrscheinlich auf das Fehlen von Markergenen in den ARMAN-Genomen zurückzuführen und entspricht nicht dem absoluten Wert.

Das Genom von B_DKE hingegen weist einen sehr hohen Wert von 98,6 % auf und ist somit fast komplett. Die Rekonstruktion des Genoms von C_DKE ergab mit einer Vollständigkeit von 86,3 % jedoch einen deutlich niedrigeren Wert. Vergleicht man zusätzlich die Genomgröße von C_DKE (1,6 Mbp) mit denen der beiden bisher bekannten *Cuniculiplasma* Stämme (1,87 Mbp und 1,94 Mbp) (Golyshina *et al.*, 2016) und dem von GPlasma (1,83 Mbp) (Yelton *et al.*, 2013), so wird deutlich, dass das rekonstruierte Genom von C_DKE deutlich kleiner ist. Die tatsächliche Genomgröße von C_DKE, berechnet aus den 86,3 % Vollständigkeit, läge bei 1,85 Mbp und würde damit den Genomgrößen der anderen *Cuniculiplasma* Stämme nahe kommen. Aus diesen Daten wird deutlich, dass für C_DKE nicht das ganze Genom rekonstruiert werden konnte und ca. 15 % fehlen. Auch die Anzahl der in C_DKE detektierten Gene unterstreicht diese Annahme, da sie mit 1556 Genen deutlich niedriger als die der beiden *Cuniculiplasma* Stämme und GPlasma, mit über 1900 Genen, liegt.

Die Gendichte der analysierten Genome von B_DKE und C_DKE ist mit 87,4 % und 89,2 % etwas niedriger als die von A_DKE mit 91,5 %. Damit liegt die Gendichte der *Thermoplasmatales* im Durchschnitt der meisten prokaryotischen Genome (85 % bis 90 %,

Land *et al.*, 2014), wobei A_DKE eine leicht erhöhte Gendichte aufweist. Auch die Genome von ARMAN-2, -4 und -5 weisen mit 91,4 %, 90,7 % und 90,8 % eine ähnlich hohe Gendichte wie A_DKE auf. Im Gegensatz zu dem ARMAN ist *N. equitans* mit einer der bisher höchsten Gendichten von ~95 % beschrieben (Waters *et al.*, 2003).

Ein Vergleich der Genome der in den Anreicherungskulturen vorkommenden Archaea mit den Genomen ihrer nächstverwandten Organismen (Abb. 4-5) macht deutlich, dass A_DKE ähnlich viele Genfamilien besitzt wie ARMAN-2, wohingegen das Genom von ARMAN-4 eine geringere Anzahl aufweist. Im Vergleich zu den *Thermoplasmatales* haben die ARMAN in Konsistenz mit ihrer kleineren Genomgröße insgesamt auch weniger Genfamilien. Das Genom von C_DKE wiederum zeigt eine geringere Anzahl an Genfamilien als *Cuniculiplasma divulgatum* S5, was auf die Unvollständigkeit des rekonstruierten Genoms zurückgeführt werden kann. B_DKE hingegen hat mit Ausnahme von *T. acidicola*, welcher sich deutlich von den anderen *Thermoplasmatales* unterscheidet, zusammen mit *C. divulgatum* und *F. acidarmanus* die meisten Genfamilien. Auch bei der Verteilung der Genfamilien am Gesamtgenom unterscheiden sich die ARMAN stark von den *Thermoplasmatales*, was auf ihre entfernte Verwandtschaft zurückgeführt werden kann. Die unterschiedliche Verteilung mancher Genfamilien in C_DKE und *C. divulgatum* hingegen kann ein Hinweis auf einen neuen Stamm innerhalb der Art hinweisen. Das auf dem Anteil der geteilten Genfamilien hierarchisch clusternde Dendrogramm bestätigt die nahe Verwandtschaft von B_DKE zu *T. acidicola*, wobei *C. divulgatum* hingegen recht weit entfernt clustert.

Des Weiteren wird aus der Abbildung deutlich, dass sich die ARMAN vergleichsweise wenig Genfamilien mit den *Thermoplasmatales* teilen, was wiederum auf ihre entfernte Verwandtschaft hindeutet. Auch wird die enge Verwandtschaft von A_DKE und ARMAN-2 deutlich, welche bereits über den Stammbaum der 16S rDNA Sequenzen sichtbar war. ARMAN-4 und -5 grenzen sich auch hier als „Parvarchaea“ von den „Micrarchaea“ ab, zu denen ARMAN-2 gezählt wird. Dies unterstreicht auch der Vergleich der GC-Gehalte (Abb. 4-6), die in ARMAN-2 und A_DKE sehr ähnlich und im Vergleich zu ARMAN-4 und -5 deutlich erhöht sind. A_DKE kann von den anderen ARMAN-Spezies zusätzlich durch 227 einzigartige Genfamilien abgegrenzt werden. Da nur 15 der 227 Genfamilien annotiert werden konnten, lässt sich keine genauere Aussage darüber treffen, in welchen Stoffwechseleigenschaften sich A_DKE von den anderen ARMAN-Spezies unterscheidet.

5.3 Analyse des ARMAN/A_DKE Stoffwechsels

Vergleicht man den Zentralmetabolismus der unterschiedlichen ARMAN-Spezies untereinander, so wird deutlich, dass sich A_DKE mit seinem Zuckermetabolismus von den bisher sequenzierten ARMAN abgrenzt. So konnten in A_DKE keine proteincodierenden Gene für die Glykolyse/Gluconeogenese gefunden werden und nur zwei codierende Gene, welche in den Pentosephosphatweg involviert sind. Auch Gene welche die Schlüsselreaktion des Entner-Doudoroff Weges codieren, konnten nicht identifiziert werden. Aus diesen Daten kann gefolgert werden, dass A_DKE für den Stoffwechsel notwendige Hexosen und Pentosen aus der Umgebung aufnehmen muss. Im Gegensatz dazu wurde für ARMAN-4 und -5 der Pentosephosphatweg beschrieben und eine unvollständige Glykolyse in ARMAN-2 (Baker *et al.*, 2010). Auch im Zusammenhang mit der β -Oxidation wurden nur die 3-Hydroxyacyldehydrogenase und die Acetyl-CoA Thiolase in A_DKE identifiziert. Hingegen ist im Genom von A_DKE ein vollständiger Citratzyklus vorhanden. Einzig für die Succinyl-CoA Synthetase wurde nur eine Untereinheit detektiert. Elektronentransportketten in Archaeen unterscheiden sich stark von denen in Bakterien und können besondere Zusammensetzungen aufweisen, die meist noch nicht vollständig entschlüsselt sind (Schäfer *et al.*, 1999). Trotzdem kann aus den bioinformatischen Daten auf die Existenz einer NADH-Dehydrogenase, einer Succinatdehydrogenase und einer ATP-Synthase im A_DKE Genom geschlossen werden. Obwohl A_DKE ausgehend von diesen Daten anscheinend nur zu eingeschränkten Stoffwechselleistungen befähigt ist, grenzt er sich durch das Vorhandensein eines vollständigen Citratzyklus vom parasitisch lebenden *N. equitans* ab, in dessen Genom keiner der zentralen Stoffwechselwege gefunden wurde (Waters *et al.*, 2003). Für *N. acidilobi* hingegen ist eine fast vollständige Gluconeogenese/Glykolyse beschrieben, wobei unklar ist, ob *N. acidilobi* die Glykolyse ablaufen lassen kann (Wurch *et al.*, 2016). Desweiteren sind die Bestandteile der Elektronentransportkette in den Genomen beider ultrakleiner Archaea entweder überhaupt nicht detekierbar oder aber noch stärker reduziert, als bei A_DKE. So sind für *N. acidilobi* keine der Komponenten beschrieben, auch nicht für die ATP-Synthase, und für *N. equitans* nur fünf Untereinheiten der A_1A_0 -Typ ATP- Synthase.

Aus den bioinformatischen Daten von A_DKE lassen sich bisher keine genauen Rückschlüsse auf dessen Energiemetabolismus ziehen. Der vollständige Citratzyklus wäre ein Weg zur ATP/GTP Produktion, der aber gleichzeitig Reduktionsäquivalente liefert, zu deren Oxidation

der nötige Elektronenakzeptor bis dato unbekannt ist. Insofern die Anreicherungskulturen unter Sauerstoffausschluss inkubiert wurden, ist ein anaerober/mikroaerober Lebensstil für A_DKE möglich. Da aber keine Hinweise für einen fermentativen Stoffwechsel gefunden wurden, kommen als Elektronenakzeptoren, welche im Kultivierungsmedium vorhanden sind, nur Fe(III) oder Sulfat infrage. Eine weitere Möglichkeit wäre ein Elektronentransfer zwischen den unterschiedlichen Mitgliedern der Ko-Kulturen. Zusammenfassend kann davon ausgegangen werden, dass ARMAN einen in ihrer Gesamtheit bisher unbekanntem Elektronentransfer für die Elektronentransportkette entwickelt haben, mit Bestandteilen, welche bisher nicht über bioinformatische Analysen detektiert werden können.

5.4 Vergleich B_DKE und C_DKE mit anderen *Thermoplasmales*

Ein Vergleich der Genome von B_DKE und C_DKE mit ihren nächsten Verwandten (Abb. 4-7) zeigt deutlich, dass sich C_DKE und *C. divulgatum* die meisten Gene miteinander teilen und auch einen ähnlich hohen GC-Gehalt besitzen, was ihre nahe Verwandtschaft bestätigt. Ein Blick auf die Genfamilien, welche sich die beiden Organismen teilen, macht jedoch deutlich, dass C_DKE, trotz des reduzierten Genoms, 80 einzigartige Genfamilien besitzt, welche in *C. divulgatum* nicht zu finden sind. Dies deutet auf einen neuen Stamm hin.

B_DKE hingegen zeigt einen höheren GC-Gehalt und eine deutlich niedrigere Anzahl an Genen, die mit den anderen drei *Thermoplasmales* geteilt werden. Auch die hohe Anzahl an einzigartigen Genfamilien von B_DKE, die fast die Hälfte der im Genom detektierten Genfamilien im Vergleich zu C_DKE und *T. acidicola* ausmacht, unterstreichen die vorherigen Ergebnisse und die Annahme, dass B_DKE einer neuen Gattung innerhalb der *Thermoplasmales* angehört. Vergleicht man die Verteilung der Genfamilien von B_DKE und C_DKE, so ist die extrem hohe Anzahl an ABC-Transportern in B_DKE auffällig. Dies spricht für ein hohes Import- bzw. Exportverhalten der Zellen.

Der Zentralstoffwechsel in B_DKE und C_DKE ist vergleichbar mit dem anderer Mitglieder der *Thermoplasmales*. So wurden alle proteincodierenden Gene für den nicht-oxidativen Pentosephosphatweg gefunden, welcher auch in anderen *Thermoplasmales* zu finden ist (Bräsen *et al.*, 2014). Das Fehlen des Schlüsselenzyms KD(P)GA für den nicht-phosphorylierten Entner-Doudoroff Weg (ED) in C_DKE hingegen erscheint daher ungewöhnlich. So wurde dieser Stoffwechselweg u.a. in *Thermoplasma acidophilum*

(Budgen und Danson, 1986) und *Picrophilus torridus* (Reher *et al.*, 2010) nachgewiesen und auch im Genom von B_DKE waren alle notwendigen Proteine codiert. Selbst *C. divulgatum* und GPLasma scheinen Zucker über diesen Stoffwechselweg abzubauen (Golyshina *et al.*, 2016; Yelton *et al.*, 2013) und auch in Genomen unkultivierter *Thermoplasmatales* wurden Gene zugehörig zum ED Weg detektiert (Yelton *et al.*, 2013). Daher kann das Fehlen des ED Weges als atypisch für die *Thermoplasmatales* und auch die Familie der *Cuniculiplasmataceae* angesehen werden, was die Frage aufwirft, ob das Fehlen des Schlüsselenzyms auf die Unvollständigkeit des Genoms von C_DKE zurückzuführen ist.

Da keines der Genome der beiden kultivierten *Thermoplasmatales* eine Phosphofruktokinase enthält, kann ein Zuckerabbau über die Glykolyse hingegen ausgeschlossen werden. Für die Gluconeogenese sind bis auf die Fructose-1,6-bisphosphat Aldolase (FBP Aldolase) alle notwendigen Enzyme codiert. Dieser Umstand trifft auf die meisten archaeellen Genome zu, inklusive der von *T. acidophilum* (Ruepp *et al.*, 2000), *P. torridus* (Fütterer *et al.*, 2004) und *C. divulgatum* (Golyshina *et al.*, 2016). Say und Fuchs entdeckten im Jahr 2010 eine bifunktionelle FBP-Aldolase-Phosphatase, welche einen unidirektionalen Weg der Gluconeogenese garantiert und in fast allen Gruppen der Archaea zu finden ist. Sie postulierten daher, dass die FBP-Aldolase-Phosphatase das ursprüngliche gluconeogenetische Enzym darstellt. Ein entsprechendes Gen wurde sowohl im Genom von B_DKE, als auch in C_DKE und sogar in GPLasma (Golyshina *et al.*, 2016) gefunden.

Die Gene für den Citratzyklus sind vollständig in den Genomen von B_DKE und C_DKE enthalten, wohingegen in *C. divulgatum* keine 2-Oxoglutarat Dehydrogenase, Fumarat-Reduktase und Fumarase gefunden wurden (Golyshina *et al.*, 2016). Laut Golyshina *et al.* könnten die fehlenden Enzyme durch Enzyme, welche ähnliche Reaktionen katalysieren, ersetzt werden. Des Weiteren wurden mit der Succinat Dehydrogenase/Fumarat-Reduktase und der 2-Oxoglutarat/2-Oxoacid-Ferredoxin-Oxidoreduktase zwei Schlüsselenzyme für den reduktiven Citratzyklus detektiert, wobei aber das dritte Schlüsselenzym, die ATP-Citrat-Lyase in allen drei analysierten Genomen fehlt.

Enzyme für die Elektronentransportkette sind mit einer NADH-Dehydrogenase, einer Succinat Dehydrogenase und einer ATP-Synthase sowohl in B_DKE, als auch in C_DKE codiert. Außerdem enthalten beide Genome Gene für eine Cytochrom c-Oxidase, wobei das zugehörige Cytochrom c in beiden Fällen fehlt. Jedoch besitzt B_DKE ein Gen welches für ein Kupferprotein der Plastocyanin/Azurin Familie codiert und Cytochrom c funktionell ersetzen

kann (Schäfer *et al.*, 1999). Den Komplex III der Atmungskette betreffend besitzen beide *Thermoplasmales* ein codierendes Gen für ein Rieske/FeS Protein, welches die charakteristische Komponente des Komplex III darstellt und darüberhinaus in B_DKE ein Gencluster mit einem Cytochrom-*b*₆-ähnlichen Protein bildet. Zusammen können sie die Funktion des Komplex III einnehmen (Schäfer *et al.*, 1999). Dennoch bleibt ungeklärt, wie diese unvollständige Elektronentransportkette an die Reduktion des im Medium vorhandenen Fe(III) gekoppelt ist, welches zumindest von B_DKE vollständig reduziert werden kann (s.u.).

5.5 Analyse des Metatranskriptoms

Die Verteilung der Metatranskriptomreads für B_DKE, A_DKE und C_DKE ist mit 1:0,5:0,27 überraschend, da für die ARMAN eine extrem niedrige Anzahl an Ribosomen beschrieben ist. Durch die hohe Anzahl an A_DKE RNA kann daher auf eine rege Aktivität und hohe Anzahl der ARMAN zum Zeitpunkt der Probenahme geschlossen werden.

Generell wurden alle Enzyme, welche für die zentralen Stoffwechselwege identifiziert wurden, auch in A_DKE exprimiert. Da nur 6 der 20 am höchsten exprimierten Gene annotiert werden konnten, kann hieraus leider keine Aussage über potentielle metabolische Reaktionen getroffen werden. Einzig die Glutamatdehydrogenase ist sehr hoch exprimiert, wodurch Glutamat eine Kohlenstoff- und Energiequelle für A_DKE darstellen könnte. Das Enzym katalysiert die Reaktion von Glutamat zu 2-Oxoglutarat, einem Intermediat des Citratzyklus, und umgekehrt.

Auch für B_DKE und C_DKE konnten alle Enzyme der zentralen Stoffwechselwege im Transkriptom wiedergefunden werden. Ebenfalls ist die Glutamatdehydrogenase recht hoch exprimiert und damit übereinstimmend sind auch die Enzyme des Citratzyklus höher exprimiert, als die des ED Weges. Die Frage nach der Variante des ED Weges in B_DKE bleibt jedoch schwierig zu beantworten. So wird neben den Enzymen für den nicht-phosphorylierten Weg auch die Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase des semi-phosphorylierten Weges exprimiert. Da das Schlüsselenzym, die 2-keto-3-desoxy-(Phospho)Gluconat-Aldolase (KD(P)GA) sowohl die phosphorylierte, als auch die nicht-phosphorylierte Variante katalysieren kann, wäre auch ein verzweigter ED Weg denkbar (Siebers und Schönheit, 2005), wobei hierfür die KDG-Kinase fehlen würde.

Unter den 20 höchst-exprimierten Genen sind sowohl in B_DKE als auch in C_DKE codierende Gene für Proteine gegen oxidativen Stress und welche für die Elektronentransportkette zu finden. Die hohen Expressionsraten der Sauerstoffstress-zugehörigen Proteine könnten auf die Präsenz geringer Sauerstoffmengen im Medium zurückzuführen sein, bedingt durch das Fehlen eines Reduktionsmittels.

5.6 Wachstumsversuche mit A_DKE, B_DKE und C_DKE

Die Analyse der Timeline aus A_DKE, B_DKE und C_DKE zeigt eine lange Lag-Phase, nach der in der exponentiellen Phase die Zellzahlen von A_DKE als auch der *Thermoplasmales* deutlich anstiegen, wobei sich die Zellzahlen zu allen Zeitpunkten recht ähnlich waren. Erst am Ende der exponentiellen Phase ist eine Dominanz der *Thermoplasmales* zu erkennen. Während der Kultivierungen war stets das ausschließliche Auftreten der A_DKE Zellen in Aggregaten aus *Thermoplasmales* zu beobachten. A_DKE Einzelzellen waren sehr selten und auch nur in Stadien mit sehr hoher Zelldichte zu erkennen. So überlagerten sich die CARD-FISH Bilder der Färbungen für A_DKE und für die *Thermoplasmales* in den angefärbten Zell-Aggregaten in den meisten Fällen fast vollständig (Abb. 4-10). Bezieht man nun die Ergebnisse der bioinformatischen Daten mit in diese Beobachtungen ein, welche eine Zucker-bedingte Abhängigkeit von A_DKE indizieren, so kann aus der Annahme, dass die Aggregate aus extrapolymerer Matrix aufgebaut sind und dass weiterhin diese Matrizen eine hohe Konzentration an Zuckerbausteinen enthalten (Flemming und Wingender, 2010) postuliert werden, dass das Wachstum in Zell-Aggregaten aus *Thermoplasmales* für A_DKE entscheidend für deren Versorgung mit Zuckern ist. Dies wird durch die Beobachtung gestützt, dass A_DKE niemals in Kulturen detektiert werden konnte, in denen die *Thermoplasmales* keine Aggregate bildeten. Ob die Aggregatbildung von B_DKE stressbesingt ist oder durch A_DKE induziert wird, bleibt hingegen zu klären. Vergleicht man dieses Wachstumsverhalten mit dem als nahrungsabhängigen Parasiten beschriebenen *Nanoarchaeum equitans*, so wird deutlich, dass sich das Wachstumsverhalten der beiden ultrakleinen Archaeen deutlich voneinander unterscheidet. So zeigt eine Wachstumskurve von *N. equitans* und seinem Wirt *Ignicoccus hospitalis*, dass das Nanoarchaeum zwar ebenfalls eine lange Lag-Phase aufweist, im Gegensatz zu A_DKE aber erst in die exponentielle Phase eintritt, wenn sein Wirt das Ende seiner exponentiellen Phase fast

erreicht hat (Jahn *et al.*, 2008). Die höchsten *N. euqitans* Zellzahlen wurden zum Zeitpunkt der stationären Phase von *I. hospitalis* beschrieben. Außerdem wächst *I. hospitalis* stets als Einzelzelle und zeigt vermehrt direkt angelagerte *N. euqitans* Zellen. Die Wachstumsexperimente der beiden Archaeen lassen vermuten, dass *N. euqitans* seinen Wirt entweder direkt tötet oder aber sich von toten *I. hospitalis* Zellen ernährt. Ein solches Verhalten wird für A_DKE nicht erwartet, da sich die Zellzahlen von A_DKE und den *Thermoplasmatales* in allen Wachstumsphasen kaum voneinander unterschieden. Damit ähnelt das Wachstumsverhalten von A_DKE eher dem von *Nanopusillus acidilobi*, welcher ebenfalls an seinen Wirt angepasste Wachstumsphasen zeigt (Wurch *et al.*, 2016).

5.7 Wachstumsversuche mit A_DKE und B_DKE

Die vollständige Verdrängung von C_DKE nachdem keinerlei Antibiotika mehr zum Medium gegeben wurden, könnte auf eine erhöhte Fitness von B_DKE zurückzuführen sein. Da Anfangs vier unterschiedliche Antibiotika Anwendung fanden, könnte B_DKE dadurch in seinem Wachstum gehemmt worden sein, wodurch C_DKE seine Nische im Konsortium fand. Für eine erhöhte Fitness von B_DKE spricht auch die Fe(II)-Reduktionsrate der Wachstumskurve, welche mit einer Kultur aus A_DKE und B_DKE erstellt wurde (Abb. 4-11). So traten diese Kulturen um ca. zwei Wochen früher in die exponentielle Phase ein, als die Ko-Kulturen mit C_DKE. Auch die stationäre Phase wurde bei den A_DKE/B_DKE Ko-Kulturen früher erreicht.

Insgesamt ist ein enger temperaturbedingter Zusammenhang der Eisenreduktionsrate dieser Kulturen erkennbar. So treten die bei 18 °C inkubierten Kulturen am spätesten in die exponentielle Phase ein und auch auf den CARD-FISH Bildern ist eine deutlich geringere Zellzahl zu Anfang der Kultivierungszeit zu erkennen. Die deutlich erhöhten Eisenreduktionsraten bei 30 °C und 37 °C legen eine optimale Wachstumstemperatur der in den Kulturen vorkommenden Archaeen von über 22 °C dar, was der durchschnittlichen Temperatur im Labor entspricht. 30 °C scheint die optimale Wachstumstemperatur mit der höchsten Eisenreduktionsrate darzustellen, bei der schon nach der Hälfte der Kultivierungszeit das Eisen fast vollständig reduziert war. Allerdings ähnelt auch die Kurve bei 37 °C anfangs der bei 30 °C, weist dann aber einen flacheren Steigungswinkel auf, wodurch die stationäre Phase drei Wochen später erreicht wurde. Dies könnte auf eine zu

hohe Inkubationstemperatur zurückzuführen sein. Betrachtet man die zugehörigen CARD-FISH Bilder, so wird deutlich, dass A_DKE bereits zu Anfang in den bei 37 °C inkubierten Kulturen aktiv war und später ähnlich hohe bzw. höhere Zelldichten verglichen mit B_DKE aufweist. Bei den bei niedrigeren Temperaturen inkubierten Kulturen waren stets deutlich weniger A_DKE Zellen über den gesamten Kultivierungszeitraum erkennbar. Daher wäre eine weitere Erklärung der abgeflachten Kurve der exponentiellen Phase bei 37 °C, dass die hohe Anzahl an A_DKE-Zellen B_DKE in ihrem Wachstum hemmen könnte.

Zusammenfassend deuten die Ergebnisse auf eine optimale Wachstumstemperatur von 30 °C für B_DKE hin, wobei dies durch Versuche mit der Reinkultur noch verifiziert werden muss. Die optimale Temperatur von A_DKE scheint hingegen bei 37 °C oder sogar höher zu liegen.

Die Wachstumsversuche von A_DKE und B_DKE mit dem Überstandsmediums von *Acidothrix acidophila* deuten auf eine positive Auswirkung der Stoffwechselprodukte des Pilzes auf die Wachstumsrate der Archaeen hin. Warum die Kulturen mit vorher inkubiertem Pilz eine höhere Ausgangskonzentration an Fe(II) zeigten, ist bisher nicht geklärt. Aus Wachstumsversuchen von *A. acidophila* in Picrophillus-Medium geht jedoch hervor, dass der Pilz nicht in der Lage ist das Eisen zu reduzieren. Trotz allem wird aus den Wachstumskurven ein Zusammenhang zwischen der Wachstumsrate der Archaea und dem eingesetzten Medium deutlich (Abb. 4-12). So ist die Kurve der Eisenreduktionsrate des autoklavierten Überstandsmediums, trotz der erhöhten Anfangskonzentration an Fe(II) mit der der Kontrolle vergleichbar. Der Steigungswinkel der Kurve mit filtriertem Medium hingegen ist deutlich steiler. Dies weist auf einen von *A. acidophila* produzierten, temperatursensitiven Wachstumsfaktor für die Archaeen hin. Bekannte Beispiele für solche Abhängigkeiten sind von einem Organismus produzierte Katalasen oder Nährstoffe, durch welche beispielsweise der Sauerstoffstress für andere Organismen reduziert wird, oder aber wichtige Vitamine etc. die anderen Organismen zur Verfügung gestellt werden (Stewart, 2012). Um diese Annahme zu bestätigen, müssen weitere Wachstumsversuche mit der Reinkultur von B_DKE und dem Pilzüberstand durchgeführt werden. Ein weiteres Indiz für diese These ist eine stets vollständige Auflösung der in den Kulturen wachsenden Pilzhyphen nach einigen Wochen des Wachstums. Daher wäre eine weitere Erklärung, dass die Archaea nicht nur von den

Stoffwechselprodukten von *A. acidophila* profitieren, sondern diesen möglicherweise als Saprophyten abbauen.

Diese Hypothese eines saprophytisch Lebensstils der *Thermoplasmatales* wurde auch von Justice *et al.* (2012) postuliert.

5.8 Isolierungsversuche

Die angewendeten Isolierungsstrategien führten bisher nur bedingt zum Erfolg. So ist ein Erklärungsansatz für das ausbleibende Wachstum der Verdünnungsreihen das mögliche Unterschreiten der kritischen Zelldichte, ohne die eine Vermehrung der Zellen nicht weiter stattfindet. Dies kann auf mögliche Quorum Sensing Prozesse zurückzuführen sein (Waters und Bassler, 2005). Unterstützt wird diese Theorie durch das ebenfalls extrem verlangsamte bzw. ausbleibende Wachstum der Ko-Kulturen nach Filtration über Spritzenvorsatzfilter mit den unterschiedlichen eingesetzten Porengrößen (Kapitel 3.1.4). So war nach der Filtration mit den kleinsten Filterporen (0,1 µm) auch nach Monaten der Inkubation kein Wachstum der Kulturen erkennbar. Dies ist entweder ebenfalls auf eine zu starke Ausdünnung der Kulturen zurückzuführen, oder aber auf eine Trennung von A_DKE und B_DKE, wodurch A_DKE seinen potentiellen Symbioten verlor und so nicht weiter zum Wachstum befähigt war.

Überraschend war jedoch, dass auch der Pilz in den über Filtern mit 0,45 µm und sogar 0,2 µm Porengröße filtrierten Anreicherungskulturen wieder anwuchs. Dies könnte auf instabile Filtermembranen zurückzuführen sein, welche bei der Filtration möglicherweise gerissen waren. Nach Rücksprache mit Mitarbeitern der DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH) sei es nicht ungewöhnlich, dass trotz Sterilfiltration Pilze in den vermeintlich sterilen Medien wieder anwachsen.

Jedoch gelang die Elimination des Pilzes durch eine Filtration durch einen 0,45 µm Spritzenvorsatzfilter aus einer Kultur, die laut PCR-Analysen keine anderen Archaeen außer B_DKE mehr aufwies. Nach fünf Monaten der Inkubation war eine dicht gewachsene Reinkultur von B_DKE nachzuweisen. B_DKE ist nach ersten Kultivierungsversuchen dazu in der Lage das im Medium enthaltene Eisen vollständig abzubauen. Weitere Versuche sollen die optimalen Wachstumsbedingungen von B_DKE klären und die Charakterisierung dieses Vertreters einer neuen Gattung innerhalb der *Thermoplasmatales* weiterführen. Außerdem

können mit der Reinkultur vergleichende Wachstumskurven mit der Ko-Kultur aus A_DKE und B_DKE gestartet werden, um so weitere Einblicke in die mögliche Interaktion der beiden Archaeen zu erlangen.

Die bisher gescheiterten Isolierungsversuche über verfestigte Medien könnten auf eine mögliche Sensitivität der Archaea gegenüber organischen Substanzen zurückzuführen sein, wie sie für die meisten Acidophilen beschrieben ist. Die verwendeten Substanzen bestehen zwar aus weniger diversen Komponenten als üblicherweise verwendeter Agar und auch Isolierungs- und Wachstumsversuche mit anderen Vertretern der *Thermoplasmatales* waren mit Stärke und PhytaGel bereits erfolgreich (Schleper *et al.*, 1995; Seegerer *et al.*, 1988; Itoh *et al.*, 2007). Trotz allem könnten weitere Versuche mit Silikagel, welches ein vollständig anorganisches Verfestigungsmittel darstellt (Kingsbury und Barghoorn, 1954), eher zum Erfolg führen. Aber auch die Nutzung von Double-Layer Platten (Johnson und McGinness, 1991), in welche ein die organischen Substanzen abbauendes Bakterium oder Archaeum eingegossen wird, oder aber Shake Rolls, bei denen die zu isolierenden Organismen direkt in das verfestigte Medium eingegossen werden, wären denkbare Ansätze. Bei all diesen Strategien ist der Erfolg einer Isolation von A_DKE jedoch recht fraglich, da der Grad der Abhängigkeit von A_DKE zu B_DKE noch nicht vollständig geklärt ist.

Daher wurde die Kultivierung in mikrofluidischen Fließzellen als weitere Anreicherungs- bzw. Isolationsstrategie gewählt. Nach 15 Wochen der Inkubation in den Fließzellen waren recht dichte Biofilme aus B_DKE erkennbar. Des Weiteren konnten Einzelzellen von A_DKE detektiert werden. Ob die Anreicherung und Isolation von A_DKE über die Anzucht eines B_DKE-Biofilms erfolgreich ist, müssen weiterführende Versuche zeigen.

Die Ergebnisse deuten jedoch darauf hin, dass *A. acidophila* über diese Kultivierungstechnik anscheinend erfolgreich aus den Kulturen eliminiert werden konnte. Als mögliche Ursache hierfür wäre eine zu geringe Kohlenstoffkonzentration im Durchflussmedium denkbar. Der dem Medium zugesetzte Hefeextrakt und das Caseinhydrolysat fallen bei Zugabe des Fe(III)SO_4 aus, was für die Archaea in den Batch-Versuchen jedoch keine Schwierigkeiten beim Abbau der Stoffe bereitete. Diese Präzipitation führte allerdings dazu, dass ein Großteil dieser Substanzen in den Spritzen zum Befüllen der Fließzellen zurückblieb und somit nicht für die Organismen in den Fließzellen zur Verfügung stand. Der übrige im Medium gelöste Kohlenstoff scheint den Archaea jedoch auszureichen, da das System ein Durchflusssystem darstellt und so eine permanente Versorgung mit frischem Medium sichergestellt ist.

6 Ausblick

In dieser Arbeit ist es gelungen ein Konsortium aus acidophilen Archaea zu charakterisieren, einzelne Organismen zu isolieren und die ARMAN-verwandten Organismen in einer Ko-Kultur aus nur zwei Organismen weiter anzureichern. Dies stellt die einzige bisher bekannte Kultur mit ARMAN-verwandten Organismen dar.

Eines der nächsten Ziele ist zunächst die Charakterisierung des B_DKE Isolats und die Anzucht im großen Maßstab. Aus diesen Kulturen könnte ein Lysat aus B_DKE-Zellen für die Anreicherung und mögliche Isolierung von A_DKE gewonnen werden.

Ein weiteres Ziel ist die weiterführende Anreicherung der in den Fließzellen wachsenden Biofilme aus B_DKE und A_DKE, um diese in einem nächsten Schritt zu analysieren. Erkenntnisse des Zusammenlebens der beiden Organismen könnten dann für die Gewinnung einer A_DKE Reinkultur genutzt werden. Aus den bisher gewonnenen mikroskopischen Daten kann erwartet werden, dass A_DKE in den Biofilmen aus B_DKE gut wachsen sollte. So wäre auch eine punktgenaue Probenahme aus einem möglichen von A_DKE dominierten Biofilmabschnitt denkbar, welche erst im Mikrolitermaßstab und später in immer größeren Volumina kultiviert werden würde. Eine Inkubation bei 37 °C mit B_DKE-Lysat könnte A_DKE einen Wachstumsvorteil gegenüber B_DKE geben, wodurch dieser verdrängt oder ausgedünnt werden könnte.

Ein weiterer Ansatz ist die Produktion von Polyglutamat über eine *E. coli* Mutante, welches aufgereinigt als Wachstumsfaktor für A_DKE und B_DKE getestet werden soll.

Ein Vergleich des Transkriptoms der B_DKE Reinkultur soll weiterhin Hinweise auf mögliche A_DKE induzierte Änderungen des Expressionsverhaltens von B_DKE liefern, wodurch die Bedingungen des Zusammenlebens beider Organismen besser verstanden werden könnten. Dies könnte weiterhin Indizien auf die genaue Abhängigkeit von A_DKE zu B_DKE liefern.

Referenzen

- Achtman, M. and Wagner, M. (2008) Microbial diversity and the genetic nature of microbial species. *Nat Rev Microbiol* **6**: 431–440.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. and Lipman, D.J. (1990) Basic Local Alignment Search Tool. *J Mol Biol* 403–410.
- Amaral-Zettler, L.A., Zettler, E.R., Theroux, S.M., Palacios, C., Aguilera, A. and Amils, R. (2011) Microbial community structure across the tree of life in the extreme Río Tinto. *ISME J* **5**: 42–50.
- Amaral Zettler, L.A., Gómez, F., Zettler, E., Keenan, B.G., Amils, R. and Sogin, M.L. (2002) Microbiology: eukaryotic diversity in Spain's River of Fire. *Nat Br Commun* **417**: 137.
- Angelov, A., Fütterer, O., Valerius, O., Braus, G.H. and Liebl, W. (2005) Properties of the recombinant glucose/galactose dehydrogenase from the extreme thermoacidophile, *Picrophilus torridus*. *FEBS J* **272**: 1054–1062.
- Angelov, A., Putyrski, M. and Liebl, W. (2006) Molecular and biochemical characterization of alpha-glucosidase and alpha-mannosidase and their clustered genes from the thermoacidophilic archaeon *Picrophilus torridus*. *J Bacteriol* **188**: 7123–7131.
- Bae, H.C., Cota-Robles, E.H. and Casida, L.E. (1972) Microflora of soil as viewed by transmission electron microscopy. *Appl Microbiol* **23**: 637–648.
- Baker, B.J. and Banfield, J.F. (2003) Microbial communities in acid mine drainage. *FEMS Microbiol Ecol* **44**: 139–152.
- Baker, B.J., Comolli, L.R., Dick, G.J., Hauser, L.J., Hyatt, D., Dill, B.D. *et al.* (2010) Enigmatic, ultrasmall, uncultivated Archaea. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**: 8806–8811.
- Baker, B.J., Lutz, M.A., Dawson, S.C., Bond, P.L. and Banfield, J.F. (2004) Metabolically active eukaryotic communities in extremely acidic mine drainage. *Appl Environ Microbiol* **70**: 6264–6271.
- Baker, B.J., Tyson, G.W., Goosherst, L. and Banfield, J.F. (2009) Insights into the diversity of eukaryotes in acid mine drainage biofilm communities. *Appl Environ Microbiol* **75**: 2192–2199.
- Baker, B.J., Tyson, G.W., Webb, R.I., Flanagan, J., Hugenholtz, P., Allen, E.E. and Banfield, J.F. (2006) Lineages of acidophilic archaea revealed by community genomic analysis. *Science* **314**: 1933–1935.
- Boisvert, S., Raymond, F., Godzaridis, E., Laviolette, F. and Corbeil, J. (2012) Ray Meta: scalable de novo metagenome assembly and profiling. *Genome Biol* **13**: R122.
- Brailsford, F.L., Glanville, H.C., Marshall, M.R., Golyshin, P.N., Johnes, P.J., Yates, C.A. *et al.* (2017) Microbial use of low molecular weight DOM in filtered and unfiltered freshwater: Role of ultra-small microorganisms and implications for water quality monitoring. *Sci Total Environ* **598**: 377–384.

- Bräsen, C., Esser, D., Rauch, B. and Siebers, B. (2014) Carbohydrate metabolism in Archaea: current insights into unusual enzymes and pathways and their regulation. *Microbiol Mol Biol Rev* **78**: 89–175.
- Bräuer, S.L., Cadillo-Quiroz, H., Ward, R.J., Yavitt, J.B. and Zinder, S.H. (2011) *Methanoregula boonei* gen. nov., sp. nov., an acidiphilic methanogen isolated from an acidic peat bog. *Int J Syst Evol Microbiol* **61**: 45–52.
- Bräuer, S.L., Cadillo-Quiroz, H., Yashiro, E., Yavitt, J.B. and Zinder, S.H. (2006) Isolation of a novel acidiphilic methanogen from an acidic peat bog. *Nature* **442**: 192–194.
- Budgen, N. and Danson, M.J. (1986) Metabolism of glucose via a modified Entner-Doudoroff pathway in the thermoacidophilic archaebacterium *Thermoplasma acidophilum*. *FEBS Lett* **196**: 207–210.
- Burstein, D., Harrington, L.B., Strutt, S.C., Probst, A.J., Anantharaman, K., Thomas, B.C. *et al.* (2017) New CRISPR-Cas systems from uncultivated microbes. *Nat Lett* **542**: 237–241.
- Caporaso, J.G., Bittinger, K., Bushman, F.D., Desantis, T.Z., Andersen, G.L. and Knight, R. (2010) PyNASt: A flexible tool for aligning sequences to a template alignment. *Bioinformatics* **26**: 266–267.
- Caporaso, J.G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F.D., Costello, E.K. *et al.* (2010) QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat Methods* **7**: 335–336.
- Genis, J.L. (1992) Rapid extraction of fungal DNA for PCR amplification. *Nucleic Acids Res* **20**: 2380.
- Chuan, M.C., Shu, G.Y. and Liu, J.C. (1996) Solubility of heavy metals in a contaminated soil: Effects of redox potential and pH. *Water Air Soil Pollut* **90**: 543–556.
- Cisar, J.O., Xu, D.Q., Thompson, J., Swaim, W., Hu, L. and Kopecko, D.J. (2000) An alternative interpretation of nanobacteria-induced biomineralization. *Proc Natl Acad Sci* **97**: 11511–11515.
- Comolli, L.R., Baker, B.J., Downing, K.H., Siegerist, C.E. and Banfield, J.F. (2009) Three-dimensional analysis of the structure and ecology of a novel, ultra-small archaeon. *Isme J* **3**: 159–167.
- D’Onofrio, A., Crawford, J.M., Stewart, E.J., Witt, K., Gavrish, E., Epstein, S. *et al.* (2010) Siderophores from Neighboring Organisms Promote the Growth of Uncultured Bacteria. *Chem Biol* **17**: 254–264.
- Darland, G., Brock, T.D., Samsonoff, W. and Conti, S.F. (1970) A thermophilic, acidophilic mycoplasma isolated from a coal refuse pile. *Science* **170**: 1416–1418.
- DeSantis, T.Z., Hugenholtz, P., Larsen, N., Rojas, M., Brodie, E.L., Keller, K. *et al.* (2006) Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. *Appl Environ Microbiol* **72**: 5069–5072.

- Dopson, M., Baker-Austin, C. and Bond, P.L. (2005) Analysis of differential protein expression during growth states of *Ferroplasma* strains and insights into electron transport for iron oxidation. *Microbiology* **151**: 4127–4137.
- Dopson, M., Baker-Austin, C., Hind, A., Bowman, J.P. and Bond, P.L. (2004) Characterization of *Ferroplasma* Islates and *Ferroplasma acidarmanus* sp. nov., Extreme Acidophiles from Acid Mine Drainage and Industrial Bioleaching Environments. *Appl Environ Microbiol* **70**: 2079–2088.
- Dridi, B., Fardeau, M.L., Ollivier, B., Raoult, D. and Drancourt, M. (2012) *Methanomassiliicoccus luminyensis* gen. nov., sp. nov., a methanogenic archaeon isolated from human faeces. *Int J Syst Evol Microbiol* **62**: 1902–1907.
- Droege, J., Gregor, I. and McHardy, A.C. (2015) Taxator-tk: Precise taxonomic assignment of metagenomes by fast approximation of evolutionary neighborhoods. *Bioinformatics* **31**: 817–824.
- Druschel, G.K., Baker, B.J., Gihring, T.M. and Banfield, J.F. (2004) Acid mine drainage biogeochemistry at Iron Mountain, California. *Geochem Trans* **5**: 13–32.
- Duda, V.I., Suzina, N.E., Akimov, V.I., Vaňshteĭn, M.B., Dmitriev, V. V, Barinova, E.S. *et al.* (2007) Ultrastructural organization and development cycle of soil ultramicrobacteria belonging to the class Alphaproteobacteria. *Mikrobiologiya* **76**: 652–661.
- Duda, V.I., Suzina, N.E., Esikova, T.Z., Akimov, V.N., Oleinikov, R.R., Polivtseva, V.N. *et al.* (2009) A cytological characterization of the parasitic action of ultramicrobacteria NF1 and NF3 of the genus *Kaistia* on chemoorganotrophic and phototrophic bacteria. *FEMS Microbiol Ecol* **69**: 180–193.
- Eddy, S. (1998) Profile hidden Markov models. *Bioinformatics* **14**: 755–763.
- Edwards, K.J., Bond, P.L., Gihring, T.M. and Banfield, J.F. (2000) An Archaeal Iron-Oxidizing Extreme Acidophile Important in Acid Mine Drainage. *Science* **287**: 1796–1799.
- Eid, J., Fehr, A., Gray, J., Luong, K., Lyle, J., Otto, G. *et al.* (2009) Real-Time DNA Sequencing from Single Polymerase Molecules. *Science* **323**: 133–139.
- Flemming, H.-C. and Wingender, J. (2010) The Biofilm Matrix. *Nat Rev Microbiol* **8**: 623–633 .
- Folk, R.L. (1993) SEM imaging of bacteria and nanobacteria in carbonate sediments and rocks. *J Sediment Petrol* **63**: 990–999.
- Fröhlich, J. and König, H. (2000) New techniques for isolation of single prokaryotic cells. *FEMS Microbiol Rev* **24**: 567–572.
- Fütterer, O., Angelov, a, Liesegang, H., Gottschalk, G., Schleper, C., Schepers, B. *et al.* (2004) Genome sequence of *Picrophilus torridus* and its implications for life around pH 0. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 9091–9096.
- Garcia-Ruiz, J.M., Melero-Garcia, E. and Hyde, S.T. (2009) Morphogenesis of Self-Assembled Nanocrystalline Materials of Barium Carbonate and Silica. *Science* **323**: 362–365.

- Geiger, K. (2016) Wachstum an Kathoden: Ökologische, physiologische und molekulare Untersuchung zur stromgetriebenen Autotrophie.
- Giannone, R.J., Wurch, L.L., Heimerl, T., Martin, S., Yang, Z., Huber, H. *et al.* (2015) Life on the edge: functional genomic response of *Ignicoccus hospitalis* to the presence of *Nanoarchaeum equitans*. *ISME J* **9**: 101–14.
- Golyshina, O. V. (2011) Environmental, biogeographic, and biochemical patterns of archaea of the family *Ferroplasmaceae*. *Appl Environ Microbiol* **77**: 5071–5078.
- Golyshina, O. V., Kublanov, I. V., Tran, H., Korzhenkov, A.A., Lünsdorf, H., Nechitaylo, T.Y. *et al.* (2016) Biology of archaea from a novel family *Cuniculiplasmataceae* (Thermoplasmata) ubiquitous in hyperacidic environments. *Sci Rep* **6**: 39034.
- Golyshina, O. V., Pivovarova, T.A., Karavaiko, G.I., Kondrat'eva, T.F., Moore, E.R.B., Abraham, W.R. *et al.* (2000) *Ferroplasma acidiphilum* gen. nov., sp. nov., an acidophilic, autotrophic, ferrous-iron-oxidizing, cell-wall-lacking, mesophilic member of the *Ferroplasmaceae* fam. nov., comprising a distinct lineage of the Archaea. *Int J Syst Evol Microbiol* **50**: 997–1006.
- Golyshina, O. V., Yakimov, M.M., Lünsdorf, H., Ferrer, M., Nimtz, M., Timmis, K.N. *et al.* (2009) *Acidiplasma aeolicum* gen. nov., sp. nov., a euryarchaeon of the family *Ferroplasmaceae* isolated from a hydrothermal pool, and transfer of *Ferroplasma cupricumulans* to *Acidiplasma cupricumulans* comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* **59**: 2815–2823.
- Golyshina, O. V., Lünsdorf, H., Kublanov, I. V., Goldenstein, N.I., Hinrichs, K.-U. and Golyshin, P.N. (2016) The novel extremely acidophilic, cell-wall-deficient archaeon *Cuniculiplasma divulgatum* gen. nov., sp. nov. represents a new family, *Cuniculiplasmataceae* fam. nov., of the order *Thermoplasmatales*. *Int J Syst Evol Microbiol* **66**: 332–340.
- Gurevich, A., Saveliev, V., Vyahhi, N. and Tesler, G. (2013) QUASt: Quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics* **29**: 1072–1075.
- Hacquard, S., Kracher, B., Hiruma, K., Münch, P.C., Garrido-Oter, R., Thon, M.R. *et al.* (2016) Survival trade-offs in plant roots during colonization by closely related beneficial and pathogenic fungi. *Nat Commun* **7**: 11362.
- Hahn, M.W., Lünsdorf, H., Wu, Q., Höfle, M.G., Boenigk, J., Stadler, P. *et al.* (2003) Isolation of novel ultramicrobacteria classified as actinobacteria from five freshwater habitats in Europe and Asia. *Appl Environ Microbiol* **69**: 1442–1451.
- Haldimann, A. and Wanner, B.L. (2001) Conditional-replication, integration, excision, and retrieval plasmid-host systems for gene structure-function studies of bacteria. *J Bacteriol* **183**: 6384–6393.
- Hawkes, R.B., Franzmann, P.D., O'hara, G. and Plumb, J.J. (2006) *Ferroplasma cupricumulans* sp. nov., a novel moderately thermophilic, acidophilic archaeon isolated from an industrial-scale chalcocite bioleach heap. *Extremophiles* **10**: 525–530.

- Huber, H., Hohn, M.J., Rachel, R., Fuchs, T., Wimmer, V.C. and Stetter, K.O. (2002) A new phylum of Archaea represented by a nanosized hyperthermophilic symbiont. *Nature* **417**: 63–67.
- Huber, H. and Stetter, K.O. (2001) *Thermoplasmatales*. In *The Prokaryotes: An evolving electronic resource for the microbiological community*. Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H., and Stackebrandt, E. (eds). Springer, New York.
- Hujslová, M., Kubátová, A., Kostov, M., Blanchette, R.A. and Beer, Z.W. De (2014) Three new genera of fungi from extremely acidic soils. *Mycol Prog* **13**: 819–831.
- Hyatt, D., Chen, G.-L., Locascio, P.F., Land, M.L., Larimer, F.W. and Hauser, L.J. (2010) Prodigal: prokaryotic gene recognition and translation initiation site identification. *BMC Bioinformatics* **11**: 119.
- Itoh, T., Yoshikawa, N. and Takashina, T. (2007) *Thermogymnomonas acidicola* gen. nov., sp. nov., a novel thermoacidophilic, cell wall-less archaeon in order *Thermoplasmatales*, isolated from a solfataric soil in Hakone, Japan. *Int J Syst Evol Microbiol* **57**: 2557–2561.
- Jahn, U., Gallenberger, M., Paper, W., Junglas, B., Eisenreich, W., Stetter, K.O. et al. (2008) *Nanoarchaeum equitans* and *Ignicoccus hospitalis*: New insights into a unique, intimate association of two archaea. *J Bacteriol* **190**: 1743–1750.
- Johnson, D.B. (1998) Biodiversity and ecology of acidophilic microorganisms. *FEMS Microbiol Ecol* **27**: 307–317.
- Johnson, D.B. and McGinness, S. (1991) A highly efficient and universal solid medium for growing mesophilic and moderately thermophilic, iron-oxidizing, acidophilic bacteria. *J Microbiol Methods* **13**: 113–122.
- Justice, N.B., Pan, C., Mueller, R., Spaulding, S.E., Shah, V., Sun, C.L. et al. (2012) Heterotrophic archaea contribute to carbon cycling in low-pH, suboxic biofilm communities. *Appl Environ Microbiol* **78**: 8321–8330.
- Kaeberlein, T., Lewis, K. and Epstein, S.S. (2002) Isolating “Uncultivable” Microorganisms in Pure Culture in a Simulated Natural Environment. *Science* **296**: 1127–1129.
- Kajander, E.O. and Ciftcioglu, N. (1998) Nanobacteria: an alternative mechanism for pathogenic intra- and extracellular calcification and stone formation. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 8274–8279.
- Kanehisa, M. and Goto, S. (2000) KEGG: Kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Res* **28**: 27–30.
- Kang, D.D., Froula, J., Egan, R. and Wang, Z. (2015) MetaBAT, an efficient tool for accurately reconstructing single genomes from complex microbial communities. *PeerJ* **3**.
- Kato, S., Yanagawa, K., Sunamura, M., Takano, Y., Ishibashi, J.I., Kakegawa, T. et al. (2009) Abundance of Zetaproteobacteria within crustal fluids in back-arc hydrothermal fields of the Southern Mariana Trough. *Environ Microbiol* **11**: 3210–3222.

- Kingsbury, J.M. and Barghoorn, E.S. (1954) Silica gel as a microbiological medium: potentialities and a new method of preparation. *Appl Microbiol* **2**: 5–8.
- Kjelleberg, S. (1993) In *Trends in Microbial Ecology*. Guerrero, R., and Pedros-Alio, C. (eds). Spanish Society for Microbiology, .
- Krause, S. (2013) Isolierung und physiologische Charakterisierung neuartiger Archaea. .
- Krzywinski, M., Schein, J., Birol, I., Connors, J., Gascoyne, R., Horsman, D. *et al.* (2009) Circos: an Information Aesthetic for Comparative Genomics. *Genome Res* **19**: 1639–1645.
- Lagesen, K., Hallin, P., Rødland, E.A., Stærfeldt, H.H., Rognes, T. and Ussery, D.W. (2007) RNAmmer: Consistent and rapid annotation of ribosomal RNA genes. *Nucleic Acids Res* **35**: 3100–3108.
- Land, M.L., Hyatt, D., Jun, S.-R., Kora, G.H., Hauser, L.J., Lukjancenko, O. and Ussery, D.W. (2014) Quality scores for 32,000 genomes. *Stand Genomic Sci* **9**: 1–10.
- Langmead, B. and Salzberg, S.L. (2013) Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Natl Institutes Heal* **9**: 357–359.
- Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A., Fennell, T., Ruan, J., Homer, N. *et al.* (2009) The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics* **25**: 2078–2079.
- Lo, I., Deneff, V.J., Verberkmoes, N.C., Shah, M.B., Goltsman, D., DiBartolo, G. *et al.* (2007) Strain-resolved community proteomics reveals recombining genomes of acidophilic bacteria. *Nature* **446**: 537–541.
- Luef, B., Frischkorn, K.R., Wrighton, K.C., Holman, H.-Y.N., Birarda, G., Thomas, B.C. *et al.* (2015) Diverse uncultivated ultra-small bacterial cells in groundwater. *Nat Commun* **6**: 6372.
- Macalady, J.L., Jones, D.S. and Lyon, E.H. (2007) Extremely acidic, pendulous cave wall biofilms from the Frasassi cave system, Italy. *Environ Microbiol* **9**: 1402–1414.
- Martel, J. and Young, J.D.-E. (2008) Purported nanobacteria in human blood as calcium carbonate nanoparticles. *Proc Natl Acad Sci* **105**: 5549–5554.
- Massana, R. and Murray, A. (1997) Vertical distribution and phylogenetic characterization of marine planktonic Archaea in the Santa Barbara Channel. *Appl Environ Microbiol* **63**: 50–56.
- McGinness, S. (1999) Treatment of acid mine drainage. In *Research Paper*. Commons, H.O. (ed.). London.
- Méndez-García, C., Mesa, V., Sprenger, R.R., Richter, M., Diez, M.S., Solano, J. *et al.* (2014) Microbial stratification in low pH oxic and suboxic macroscopic growths along an acid mine drainage. *ISME J* **8**: 1259–74.
- Miyoshi, T., Iwatsuki, T. and Naganuma, T. (2005) Phylogenetic characterization of 16S rRNA gene clones from deep-groundwater microorganisms that pass through 0.2-micrometer-pore-size filters. *Appl Environ Microbiol* **71**: 1084–1088.

- Moriya, Y., Itoh, M., Okuda, S., Yoshizawa, A.C. and Kanehisa, M. (2007) KAAS: An automatic genome annotation and pathway reconstruction server. *Nucleic Acids Res* **35**: 182–185.
- Nichols, D., Cahoon, N., Trakhtenberg, E.M., Pham, L., Mehta, A., Belanger, A. *et al.* (2010) Use of ichip for high-throughput in situ cultivation of “uncultivable” microbial species. *Appl Environ Microbiol* **76**: 2445–2450.
- Ondov, B.D., Bergman, N.H. and Phillippy, A.M. (2011) Interactive metagenomic visualization in a Web browser. *BMC Bioinformatics* **12**: 385
- Parks, D.H., Imelfort, M., Skennerton, C.T., Hugenholtz, P. and Tyson, G.W. (2015) CheckM: assessing the quality of microbial genomes recovered from isolates, single cells, and metagenomes. *Genome Res* **25**: 1043–55.
- Paul, K., Nonoh, J.O., Mikulski, L. and Brune, A. (2012) “Methanoplasmatales,” *Thermoplasmatales*-related archaea in termite guts and other environments, are the seventh order of methanogens. *Appl Environ Microbiol* **78**: 8245–8253.
- Pernthaler, A., Pernthaler, J. and Amann, R. (2004) Sensitive multi-color fluorescence *in situ* hybridization for the identification of environmental microorganisms. *Mol Microb Ecol Man* **3**: 711–726.
- Poulsen, M., Schwab, C., Jensen, B.B., Engberg, R.M., Spang, A., Canibe, N. *et al.* (2013) Methylophilic methanogenic Thermoplasmata implicated in reduced methane emissions from bovine rumen. *Nat Commun* **4**: 1428.
- Quinlan, A.R. and Hall, I.M. (2010) BEDTools: A flexible suite of utilities for comparing genomic features. *Bioinformatics* **26**: 841–842.
- Raes, J., Korbil, J.O., Lercher, M.J., Mering, C. von and Bork, P. (2007) Prediction of effective genome size in metagenomic samples. *Genome Biol* **8**: R10.1-R10.11.
- Rainey, F.A., Dorsch, M., Morgan, H.W. and Stackebrandt, E. (1992) 16S rDNA Analysis of *Spirochaeta thermophila*: Its Phylogenetic Position and Implications for the Systematics of the Order Spirochaetales. *Syst Appl Microbiol* **15**: 197–202.
- Raoult, D., Drancourt, M., Azza, S., Nappes, C., Guieu, R., Rolain, J.M. *et al.* (2008) Nanobacteria are mineralo fetuin complexes. *PLoS Pathog* **4**: 1–8.
- Rappé, M.S., Connon, S. a, Vergin, K.L. and Giovannoni, S.J. (2002) Cultivation of the ubiquitous SAR11 marine bacterioplankton clade. *Nature* **418**: 630–633.
- Reher, M., Fuhrer, T., Bott, M. and Schönheit, P. (2010) The nonphosphorylative entner-doudoroff pathway in the thermoacidophilic euryarchaeon *Picrophilus torridus* involves a novel 2-Keto-3-deoxygluconate- specific aldolase. *J Bacteriol* **192**: 964–974.
- Reysenbach, A.-L., Liu, Y., Banta, A.B., Beveridge, T.J., Kirshtein, J.D., Schouten, S. *et al.* (2006) A ubiquitous thermoacidophilic archaeon from deep-sea hydrothermal vents. *Nature* **442**: 444–447.

- Ruepp, A., Graml, W., Santos-Martinez, M.L., Koretke, K.K., Volker, C., Mewes, H.W. *et al.* (2000) The genome sequence of the thermoacidophilic scavenger *Thermoplasma acidophilum*. *Nature* **407**: 508–513.
- Sanz, J.L., Rodríguez, N., Díaz, E.E. and Amils, R. (2011) Methanogenesis in the sediments of Rio Tinto, an extreme acidic river. *Environ Microbiol* **13**: 2336–2341.
- Say, R.F. and Fuchs, G. (2010) Fructose 1,6-bisphosphate aldolase/phosphatase may be an ancestral gluconeogenic enzyme. *Nature* **464**: 1077–1081.
- Schäfer, G., Engelhard, M. and Müller, V. (1999) Bioenergetics of the Archaea. *Microbiol Mol Biol Rev* **63**: 570–620.
- Scheffler, H. (2002) *Das Elbingeröder Besucherbergwerk "Drei Kronen und Ehrt" - Wissenswertes um ein Bergwerk*. Harzdruckerei Wernigerode GmbH, Elbingerode.
- Schepers, B., Thiemann, V. and Antranikian, G. (2006) Characterization of a novel glucoamylase from the thermoacidophilic archaeon *Picrophilus torridus* heterologously expressed in *E. coli*. *Eng Life Sci* **6**: 311–317.
- Schleper, C., Puehler, G., Holz, I., Gambacorta, A., Janekovic, D., Santarius, U. *et al.* (1995) *Picrophilus* gen. nov., fam. nov.: A novel aerobic, heterotrophic, thermoacidophilic genus and family comprising archaea capable of growth around pH 0. *J Bacteriol* **177**: 7050–7059.
- Seemann, T. (2014) Prokka: Rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics* **30**: 2068–2069.
- Segerer, A., Langworthy, T.A. and Stetter, K.O. (1988) *Thermoplasma acidophilum* and *Thermoplasma volcanium* sp. nov. from Solfatara Fields. *Syst Appl Microbiol* **10**: 161–171.
- Siebers, B. and Schönheit, P. (2005) Unusual pathways and enzymes of central carbohydrate metabolism in Archaea. *Curr Opin Microbiol* **8**: 695–705.
- Singer, P.C. and Stumm, W. (1970) Acidic Mine Drainage: The rate-determining step. *Science* **167**: 1121–1123.
- Smithies, O. (1955) Zone electrophoresis in starch gels: group variations in the serum proteins of normal human adults. *Biochem J* **61**: 629–641.
- Stahl, D.A. and Amann, R. (1991) Development and application of nucleic acid probes. In *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. Stackebrandt, E., and Goodfellow, M. (eds). Wiley, Chichester, UK. pp. 205–242.
- Staley, J.T. and Konopka, A. (1985) Measurement of *In Situ* Activities of Nonphotosynthetic Microorganisms in Aquatic and Terrestrial Habitats. *Annu Rev Microbiol* **39**: 321–346.
- Steering Group for the Workshop on Size Limits of Very Small Microorganisms, National Research Council (1999) In *Size Limits of Very Small Microorganisms: Proceedings of a Workshop*. National Academies Press, pp. 5–7.
- Stewart, E.J. (2012) Growing unculturable bacteria. *J Bacteriol* **194**: 4151–4160.

- Stookey, L.L. (1970) Ferrozine - a new spectrophotometric reagent for iron. *Anal Chem* **42**: 779–781.
- Suzina, N.E., Duda, V.I., Esikova, T.Z., Shorokhova, A. P., Gafarov, A. B., Oleinikov, R.R. *et al.* (2011) Novel ultramicrobacteria, strains NF4 and NF5, of the genus *Chryseobacterium*: Facultative epibionts of *Bacillus subtilis*. *Microbiology* **80**: 535–548.
- Tan, G.L., Shu, W.S., Zhou, W.H., Li, X.L., Lan, C.Y. and Huang, L.N. (2009) Seasonal and spatial variations in microbial community structure and diversity in the acid stream draining across an ongoing surface mining site. *FEMS Microbiol Ecol* **70**: 277–285.
- Torrella, F. and Morita, R.Y. (1981) Microcultural study of bacterial size changes and microcolony and ultramicrocolony formation by heterotrophic bacteria in seawater. *Appl Environ Microbiol* **41**: 518–527.
- Tyson, G.W., Chapman, J., Hugenholtz, P., Allen, E.E., Ram, R.J., Richardson, P.M. *et al.* (2004) Community structure and metabolism through reconstruction of microbial genomes from the environment. *Nature* **428**: 37–43.
- Vossenbergh, J.L.C.M. Van de, Driessen, A.J.M., Zillig, W. and Konings, W.N. (1998) Bioenergetics and cytoplasmic membrane stability of the extremely acidophilic, thermophilic archaeon *Picrophilus oshimae*. *Extremophiles* **2**: 67–74.
- Wang, Q., Garrity, G.M., Tiedje, J.M. and Cole, J.R. (2007) Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Appl Environ Microbiol* **73**: 5261–5267.
- Waters, C.M., and Bassler, B.L. (2005) QUORUM SENSING: Cell-to-Cell Communication in Bacteria. *Annu Rev Cell Dev Biol* **21**: 319–346.
- Waters, E., Hohn, M.J., Ahel, I., Graham, D.E., Adams, M.D., Barnstead, M. *et al.* (2003) The genome of *Nanoarchaeum equitans*: insights into early archaeal evolution and derived parasitism. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 12984–8.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S. and Taylor, J. (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In *PCR protocols: a guide to methods and applications*. Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J., and White, T.J. (eds). Academic Press Inc, SanDiego. pp. 315–322.
- Woese, C.R., Kandler, O. and Wheelis, M.L. (1990) Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc Natl Acad Sci* **87**: 4576–4579.
- Wurch, L., Giannone, R.J., Belisle, B.S., Swift, C., Utturkar, S., Hettich, R.L. *et al.* (2016) Genomics-informed isolation and characterization of a symbiotic Nanoarchaeota system from a terrestrial geothermal environment. *Nat Commun* **7**: 1–10.
- Yarza, P., Yilmaz, P., Pruesse, E., Glöckner, F.O., Ludwig, W., Schleifer, K.-H. *et al.* (2014) Uniting the classification of cultured and uncultured bacteria and archaea using 16S rRNA gene sequences. *Nat Rev Microbiol* **12**: 635–645.

Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S. and Madden, T.L. (2012) Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics* **13**: 134.

Yelton, A.P., Comolli, L.R., Justice, N.B., Castelle, C., Deneff, V.J., Thomas, B.C. and Banfield, J.F. (2013) Comparative genomics in acid mine drainage biofilm communities reveals metabolic and structural differentiation of co-occurring archaea. *BMC Genomics* **14**: 485.

Zhou, H., Zhang, R., Hu, P., Zeng, W., Xie, Y., Wu, C. and Qiu, G. (2008) Isolation and characterization of *Ferroplasma thermophilum* sp. nov., a novel extremely acidophilic, moderately thermophilic archaeon and its role in bioleaching of chalcopyrite. *J Appl Microbiol* **105**: 591–601.

Ziegler, S. (2013) Bekämpfung von Acid Mine Drainage durch Anreicherung säuretoleranter alkalisierender Mikroorganismen. .

Ziegler, S., Ackermann, S., Majzlan, J. and Gescher, J. (2009) Matrix composition and community structure analysis of a novel bacterial pyrite leaching community. *Environ Microbiol* **11**: 2329–2338.

Ziegler, S., Dolch, K., Geiger, K., Krause, S., Asskamp, M., Eusterhues, K. *et al.* (2013) Oxygen-dependent niche formation of a pyrite-dependent acidophilic consortium built by archaea and bacteria. *ISME J* **7**: 1725–1737.

Anhang

Tab. A-1: Funktionelle Anreicherungsanalyse der orthoMCL Gruppen eines jeden Genoms, zugeordnet zu den angegebenen funktionellen Kategorien, zeigen signifikante Unterschiede zwischen ARMAN-verwandten und *Thermoplasmales*. (Exakter Test nach Fisher, $P=1,9E-8$; $3,6E-8$ und $5,0E-6$).

Funktion	P-Wert	in ARMAN	in THERMO	in ARMAN	in THERMO	FDR	level
Translation	6,70169E-10	88	182	3,915780041	1,669045921	1,8765E-08	***
Aminosäuremetabolismus	2,57011E-09	106	852	12,58305739	16,3270153	3,5981E-08	***
Infektionskrankheiten	5,32072E-07	38	60	3,109126351	1,8516402	4,9660E-06	***
Metabolismus von Kofaktoren und Vitaminen	8,29063E-07	86	671	5,916079783	13,50595107	5,8034E-06	***
Kohlenstoffmetabolismus	5,91152E-05	93	656	4,272001873	12,17726218	3,3104E-04	***
Metabolismus von Terpenoiden und Polyketiden	0,000435318	22	213	4,509249753	2,875388173	1,5236E-03	**
Replikation and Reparatur	0,000354307	43	103	0,957427108	3,720119046	1,5236E-03	**
Transkription	0,000406985	19	30	1,5	1,669045921	1,5236E-03	**
Signaltransduktion	0,000722403	53	142	5,909032634	3,991061441	2,2475E-03	**
Faltung, Sortieren and Abbau	0,000946476	57	159	1,892969449	3,563204817	2,6501E-03	**
Nucleotidmetabolismus	0,004129785	73	233	1,5	4,155461123	1,0512E-02	*
Energiemetabolismus	0,005618563	111	390	14,97497913	7,667184248	1,3110E-02	*
Zellwachstum und Tod	0,017245843	23	58	2,217355783	3,370036032	3,7145E-02	*
Zellmotilität	0,018843852	5	5	2,121320344	0	3,7688E-02	*
Endokrines System	0,061058894	5	8	0,5	0	1,1398E-01	
Membrantransport	0,135787818	116	631	4,242640687	16,4093832	2,3549E-01	
Nervensystem	0,142976928	0	12	NA	0	2,3549E-01	
Überblick	0,20672122	14	97	2,380476143	3,090885218	3,2157E-01	
Metabolismus anderer Aminosäuren	0,242326219	6	15	1,732050808	0,353553391	3,5711E-01	
Krebs	0,261566786	4	9	0,577350269	0,487950036	3,6619E-01	
Xenobiotica Biodegradation und Metabolismus	0,650319455	41	178	3,593976442	10,1664715	8,6709E-01	
Lipidmetabolismus	0,702545485	17	91	2,061552813	1,597989809	8,9415E-01	
Biosynthese anderer sekundärer Metabolite	0,79109035	16	83	1,414213562	1,302470181	9,6307E-01	
Wirkstoffresistenz	1	8	38	0	2,187627547	1,0000E+00	
Glycanbiosynthese und Metabolismus	1	8	39	1,414213562	0,83452296	1,0000E+00	
Umweltadaptation	1	0	3	NA	0	1,0000E+00	
Immunkrankheiten	1	0	2	NA	0	1,0000E+00	
Transport und Katabolismus	1	0	2	NA	0	1,0000E+00	

Tab. A-2: KEGG Terme für die Erstellung der Circos Plots.

Glykolyse/ Gluconeogene se	Citratzyklus	Pentose- phosphat- weg	Entner- Doudoroff Weg	Oxidative Phosphorylier ung	β-Oxidation
K00134	K00024	K00033	K00036	K00239	K00232
K00150	K00030	K00036	K00131	K00240	K00249
K00844	K00031	K00615	K00134	K00241	K00255
K00845	K00116	K00616	K00874	K00242	K06445
K00850	K00164	K01057	K00927	K00244	K01692
K00873	K00174	K01783	K01057	K00245	K13767
K00886	K00175	K01807	K01625	K00246	K07516
K00918	K00176	K01808	K01690	K00247	K01825
K00927	K00177	K01810	K03738	K00330	K01782
K01086	K00239	K06859	K07404	K00331	K00632
K01596	K00240	K07404		K00332	K07508
K01610	K00241	K08093		K00333	
K01622	K00242	K08094		K00334	
K01623	K00244	K13810		K00335	
K01624	K00245	K13831		K00336	
K01689	K00246	K15916		K00337	
K01803	K00247			K00338	
K01810	K00382			K00339	
K01834	K00658			K00340	
K02446	K01647			K00341	
K03841	K01676			K00342	
K04041	K01677			K00343	
K06859	K01678			K00404	
K11389	K01679			K00405	
K11532	K01681			K00406	
K11645	K01682			K00407	
K13810	K01902			K00410	
K15633	K01903			K00411	
K15634	K18118			K00412	
K15635				K00413	
K15916				K00425	
K16305				K00426	
K16306				K02107	
K16370				K02108	
				K02109	
				K02110	
				K02111	
				K02112	
				K02113	
				K02114	
				K02115	
				K02117	
				K02118	

				K02119	
				K02120	
				K02121	
				K02122	
				K02123	
				K02124	
				K02128	
				K02258	
				K02259	
				K02274	
				K02275	
				K02276	
				K02277	
				K02297	
				K02298	
				K02299	
				K02300	
				K02826	
				K02827	
				K02828	
				K02829	
				K03886	
				K03887	
				K03888	
				K03889	
				K03890	
				K03891	
				K03940	
				K03941	
				K03943	
				K05572	
				K05573	
				K05574	
				K05575	
				K05576	
				K05577	
				K05578	
				K05579	
				K05580	
				K05581	
				K05582	
				K05583	
				K05584	
				K05585	
				K13378	
				K13380	
				K15408	
				K15862	

Tab. A-3: Annotierte Genfamilien, welche einzigartig in A_DKE verglichen mit den anderen ARMAN-Genomen sind.

ID	KEGG Nummer	Funktion lvl1	Funktion lvl2	Funktion lvl3	Beschreibung
gfam_377	K13832	Metabolismus	Aminosäuremetabolismus	Phenylalanin, tyrosine and tryptophan biosynthesis	aroDE, DHQ-SDH, 3-Dehydrochinat Dehydratase / Shikimat Dehydrogenase [EC:4.2.1.10 1.1.1.25]
gfam_405	K01597	Metabolismus	Metabolismus von Terpenoiden und Polyketiden	Terpenoid Backbonebiosynthese	MVD, mvaD, Diphosphomevalonat Decarboxylase [EC:4.1.1.33]
gfam_414	K12454	Metabolismus	Kohlenstoffmetabolismus	Aminozucker- und Nucleotidzucker Metabolismus	rfbE, CDP-paratose 2-epimerase [EC:5.1.3.10]
gfam_423	K16160	Metabolismus	Energie-metabolismus	Methan-metabolismus	mmoB, Methanmonooxygenase regulatorisches Protein B
gfam_426	K01597	Metabolismus	Metabolismus von Terpenoiden und Polyketiden	Terpenoid Backbonebiosynthese	MVD, mvaD, Diphosphomevalonat Decarboxylase [EC:4.1.1.33]
gfam_436	K13950	Metabolismus	Metabolismus von Cofaktoren und Vitaminen	Folatbiosynthese	pabAB, Para-Aminobenzoat-Synthetase [EC:2.6.1.85]
gfam_552	K03524	Metabolismus	Metabolismus von Cofaktoren und Vitaminen	Biotin-metabolismus	birA, BirA Familie Transkriptionsregulator, Biotin Operon Repressor / Biotin-[Acetyl-CoA-Carboxylase] ligase [EC:6.3.4.15]
gfam_1082	K16150	Metabolismus	Kohlenstoffmetabolismus	Stärke und Sucrose Metabolismus	K16150, Glycogen(Stärke) Synthase [EC:2.4.1.11]
gfam_1128	K11434	Umweltinformationsverarbeitung	Signaltransduktion	FoxO Signalweg	PRMT1, Rrotein Arginin N-Methyltransferase 1 [EC:2.1.1.-]
gfam_1741	K18232	Umweltinformationsverarbeitung	Membrantransport	ABC-Transporter	oleC4, Oleandomycintransport-system ATP-bindendes Protein
gfam_1753	K00857	Metabolismus	Nucleotidmetabolismus	Pyrimidinmetabolismus	tdk, TK, Thymidinkinase [EC:2.7.1.21]
gfam_1907	K10216	Metabolismus	Übersicht	Abbau aromatischer Substanzen	dmpD, xylF, 2-Hydroxyuconat-semialdehyd-Hydrolase [EC:3.7.1.9]

gfam_2934	K16785	Umweltinformationsverarbeitung	Membrantransport	ABC-Transporter	ecfT, Energie-koppelnder Faktor Transportsystem-Permease Protein
gfam_3121	K01241	Metabolism	Nucleotid-metabolismus	Purin-metabolismus	amn, AMP-Nucleosidase [EC:3.2.2.4]

Tab. A-4: Berechnung der Kopienanzahl der 23S rRNA Gene. RPK = Reads per kilobase.

Genom	RPK in S1			RPK in S2		
	23S rRNA Gen	Median aller Gene	Mittelwert \pm SD aller Gene	23S rRNA Ggen	Median aller Gene	Mittelwert \pm SD aller Gene
A_DKE	75,582.5	96,092.1	96,042.1 \pm 12,216.3	148,337.0	203,944.0	201,755.0 \pm 22,531.3
B_DKE	113,425.0	141,111.0	141,842.0 \pm 20,907.6	44,626.6	58,081.1	58,767.9 \pm 8,550.3
C_DKE	18,981.8	19,835.6	19,633.0 \pm 2,595.7	2,474.4	2,767.1	2,750.8 \pm 350.1

Tab. A-5: KEGG-Annotationen der in den Zentralmetabolismus involvierten Enzyme des Transkriptoms von A_DKE, B_DKE und C_DKE.

Contig	Start	Stop	Beschreibung	KEGG KO	RP KM	EC
A_DKE						
TCA						
contig-1000030	59743	60903	Citratsynthase	K01647	1,1	2.3.3.1
contig-1000030	56805	59603	Aconitase	K01681	3,2	4.2.1.3
contig-21000035	20914	22143	Isocitrat-Dehydrogenase	K00031	2,3	1.1.1.42
contig-37000013	3968	5842	2-Oxoacid Oxidoreduktase (Ferredoxin)	K00174	4,2	1.2.7.11
contig-37000013	5829	6737	2-Oxoacid Oxidoreduktase (Ferredoxin)	K00175	4,2	1.2.7.11
contig-37000013	149572	151290	Succinat-Dehydrogenase/Fumarat-Reduktase, Flavoprotein Untereinheit	K00239	1,2	1.3.5.4
contig-37000013	148826	149575	Succinat-Dehydrogenase/Fumarat-Reduktase, Eisen-Schwefel Untereinheit	K00240	1,3	1.3.5.4
contig-37000013	151437	152834	Fumarat-Hydratase Klasse II	K01679	0,8	4.2.1.2
contig-1000030	55428	56795	Malat-Dehydrogenase (Quinon)	K00116	0,8	1.1.5.4

Gluconeogenese						
contig-44000010	51136	52014	Pyruvat, Wasserdikinase	K01007	0,4	2.7.9.2
contig-37000013	53865	54470	mögliche Phosphoglycerat-Mutase	K15634	0,7	5.4.2.12
ED						
contig-2000020	45362	46435	Aldose 1-Dehydrogenase [NAD(P)+]	K18125	0,6	1.1.1.359
contig-37000013	19277	20503	Gluconat/Galactonat-Dehydratase	K05308	1,1	4.2.1.140
contig-37000013	21506	22942	D-Glycerinaldehyd-Dehydrogenase	K18128	0,9	1.2.1.89
contig-44000010	151267	152337	Pyruvat-Dehydrogenase E1 Komponente alpha Untereinheit	K00161	1,3	1.2.4.1
contig-44000010	150287	151258	Pyruvat-Dehydrogenase E1 Komponente beta Untereinheit	K00162	1,7	1.2.4.1
PPP						
contig-37000013	322787	323671	Ribosphosphat - Pyrophosphokinase	K00948	0,6	2.7.6.1
Fettsäureabbau						
contig-37000013	132383	133606	Acetyl-CoA C-Acetyltransferase	K00626	0,3	2.3.1.9
Elektronen transport kette						
Komplex I						
contig-49000031	18622	19254	NADH-Quinon-Oxidoreduktase Untereinheit A	K00331	1,4	1.6.5.3
contig-49000031	19193	19564	NADH-Quinon-Oxidoreduktase Untereinheit B	K00332	1,5	1.6.5.3
contig-49000031	19561	20658	NADH-Quinon-Oxidoreduktase Untereinheit C	K00333	0,8	1.6.5.3
contig-37000013	307529	308575	NADH-Quinon-Oxidoreduktase Untereinheit G	K00337	0,4	1.6.5.3
contig-37000013	307167	307532	NADH-Quinon-Oxidoreduktase Untereinheit H	K00338	1,1	1.6.5.3
contig-37000013	304609	306375	NADH-Quinon-Oxidoreduktase Untereinheit K	K00341	0,3	1.6.5.3

contig-37000013	303188	304606	NADH-Quinon-Oxidoreduktase Untereinheit L	K00342	0,3	1.6.5.3
contig-37000013	301784	303178	NADH-Quinon-Oxidoreduktase Untereinheit M	K00343	0,3	1.6.5.3
Komplex II						
contig-37000013	149572	151290	Succinat-Dehydrogenase/Fumarat-Reduktase, Flavoprotein Untereinheit	K00239	1,2	1.3.5.4
contig-37000013	148826	149575	Succinat-Dehydrogenase/Fumarat-Reduktase, Eisen-Schwefel Untereinheit	K00240	1,3	1.3.5.4
Komplex III						
-	-	-	-	-	-	-
Komplex IV						
-	-	-	-	-	-	-
Komplex V						
contig-37000013	253083	253589	anorganische Pyrophosphatase	K01507	3,4	3.6.1.1
contig-37000013	79409	81163	V/A-Typ H ⁺ /Na ⁺ -transportierende ATPase Untereinheit A	K02117	1,2	3.6.3.14
contig-37000013	93142	95547	H ⁺ -transportierende ATPase	K01535	0,5	3.6.3.6
contig-37000013	77999	79393	V/A-Typ H ⁺ /Na ⁺ -transportierende ATPase Untereinheit B	K02118	2,1	-
contig-37000013	81523	82599	V/A-Typ H ⁺ /Na ⁺ -transportierende ATPase Untereinheit C	K02119	0,9	-
contig-37000013	77380	78012	V/A-Typ H ⁺ /Na ⁺ -transportierende ATPase Untereinheit D	K02120	1,3	-
contig-37000013	81204	81533	V/A-Typ H ⁺ /Na ⁺ -transportierende ATPase Untereinheit F	K02122	0,5	-
contig-37000013	74919	76859	V/A-Typ H ⁺ /Na ⁺ -transportierende ATPase Untereinheit I	K02123	0,8	-
Cytochrom bd Komplex						
contig-44000010	144526	145854	Cytochrom d Ubiquinol-Oxidase Untereinheit I	K00425	0,4	1.10.3.14
Amino Säure abbau						

contig-21000035	26526	27791	Glutamat-Dehydrogenase	K00261	4,9	1.4.1.3
B_DKE						
TCA						
contig-2000035	15753	16907	Citratsynthase	K01647	39,5	2.3.3.1
contig-7	43083	45779	Aconitase	K01681	22,4	4.2.1.3
contig-1000033	4676	5893	Isocitrat-Dehydrogenase	K00031	49,9	1.1.1.42
contig-7	6368	8266	2-Oxoacid Oxidoreduktase (Ferredoxin)	K00174	51,5	1.2.7.11
contig-7	110374	111222	2-Oxoacid Oxidoreduktase (Ferredoxin)	K00175	59,2	1.2.7.11
contig-32000012	37876	38730	Succinyl-CoA Synthetase alpha Untereinheit	K01902	37,3	6.2.1.5
contig-32000012	38732	39838	Succinyl-CoA Synthetase Untereinheit beta	K01903	39,0	6.2.1.5
contig-32	8060	9769	Succinat-Dehydrogenase/Fumarat-Reduktase, Flavoprotein Untereinheit	K00239	9,6	1.3.5.4
contig-32	7323	8051	Succinat-Dehydrogenase/Fumarat-Reduktase, Eisen-Schwefel Untereinheit	K00240	10,4	1.3.5.4
contig-7	113814	115187	Fumarat-Hydratase Klasse II	K01679	39,1	4.2.1.2
contig-31	24521	25495	Malat-Dehydrogenase	K00024	30,2	1.1.1.37
Gluconeogenese						
contig-32000012	127207	129864	Pyruvat, Orthophosphat-Dikinase	K01006	8,3	2.7.9.1
contig-39	29945	31819	Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase (GTP)	K01596	6,5	4.1.1.32
contig-42000024	3291	4511	Enolase	K01689	9,5	4.2.1.11
contig-32000012	219808	221022	2,3-Bisphosphoglycerat-unabhängige Phosphoglycerat-Mutase	K15635	18,4	5.4.2.12
contig-20	7053	8300	Phosphoglycerat-Kinase	K00927	20,0	2.7.2.3
contig-0	152976	154079	Glycerinaldehyde-3-Phosphat-Dehydrogenase (NAD(P))	K00150	25,6	1.2.1.59
contig-1000036	100427	101089	Triosephosphat-Isomerase	K01803	6,7	5.3.1.1
contig-1	10674	11831	Fructose 1,6-Bisphosphat-Aldolase/Phosphatase	K01622	23,4	4.1.2.13
contig-30	41933	42853	Glucose/Mannose-6-Phosphat- Isomerase	K15916	5,5	5.3.1.9
contig-8	77540	78904	Phosphomannomutase/Phosphoglucomutase	K15778	7,9	5.4.2.2

ED						
contig-22	59230	60321	Glucose/Galactose 1-Dehydrogenase (NADP+)	K18124	7,0	1.1.1.360
contig-7	45923	47110	Gluconat/Galactonat-Dehydratase	K05308	6,1	4.2.1.140
contig-1000025	45782	45782	2-dehydro-3-deoxy-D-Gluconat/2-dehydro-3-deoxy-Phosphogluconat-Aldolase	K11395	8,8	4.1.2.55
contig-0	20437	21915	D-Glycerinaldehyd-Dehydrogenase	K18128	7,8	1.2.1.89
contig-1000036	132560	134056	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase [NAD(P)+]	K18978	9,4	1.2.1.90
contig-2000035	65718	67016	Glycerat 2-Kinase	K11529	1,3	2.7.1.165
contig-0	21910	23592	Pyruvat-Kinase	K00873	10,7	2.7.1.40
contig-32	46321	47334	Pyruvat-Dehydrogenase E1 Komponente alpha Untereinheit	K00161	33,6	1.2.4.1
contig-32	47331	48299	Pyruvat-Dehydrogenase E1 Komponente beta Untereinheit	K00162	54,4	1.2.4.1
PPP						
contig-30	41933	42853	bifunktionelle Phosphoglucose/Phosphomannose-Isomerase	K15916	5,5	5.3.1.9
contig-1	10674	11831	Fructose 1,6-Bisphosphat-Aldolase/Phosphatase	K01622	23,4	4.1.2.13
contig-2000035	28105	29058	Transketolase	K00615	11,3	2.2.1.1
contig-2000035	27450	28121	Transaldolase	K00616	17,3	2.2.1.2
contig-33	14119	14769	Ribulose-Phosphat 3-Epimerase	K01783	10,9	5.1.3.1
contig-2000035	62788	63459	Ribose-5-Phosphat Isomerase A	K01807	4,4	5.3.1.6
contig-42000024	5109	6005	Ribokinase	K00852	3,2	2.7.1.15
contig-0	108922	109824	Ribose-Phosphat-Pyrophosphokinase	K00948	27,8	2.7.6.1
contig-8	77540	78904	Phosphomannomutase/Phosphoglucomutase	K15778	7,9	5.4.2.2
Fettsäureabbau						
contig-21	28264	29943	langkettige Acyl-CoA Synthetase	K01897	10,7	6.2.1.3
contig-1000035	35287	36411	Acyl-CoA-Dehydrogenase	K00249	72,9	1.3.8.7
contig-15	1722	2900	Acetyl-CoA-Acetyltransferase	K00632	9,2	2.3.1.16
contig-30	36416	37609	Acetyl-CoA-Acetyltransferase	K00626	51,5	2.3.1.9

Elektronen transport kette						
Komplex I						
contig-32000012	54709	55146	NADH-Quinon Oxidoreduktase Untereinheit A	K00330	30,8	1.6.5.3
contig-32000012	54248	54712	NADH-Quinon Oxidoreduktase Untereinheit B	K00331	27,5	1.6.5.3
contig-32000012	53784	54251	NADH-Quinon Oxidoreduktase Untereinheit C	K00332	30,1	1.6.5.3
contig-32000012	52675	53784	NADH-Quinon Oxidoreduktase Untereinheit D	K00333	28,9	1.6.5.3
contig-32000012	198303	199748	NADH-Quinon Oxidoreduktase Untereinheit F	K00335	3,2	1.6.5.3
contig-32000012	51638	52678	NADH-Quinon Oxidoreduktase Untereinheit H	K00337	18,4	1.6.5.3
contig-32000012	51207	51641	NADH-Quinon Oxidoreduktase Untereinheit I	K00338	33,8	1.6.5.3
contig-32000012	50962	51210	NADH-Quinon Oxidoreduktase Untereinheit J	K00339	29,1	1.6.5.3
contig-32000012	50443	50742	NADH-Quinon Oxidoreduktase Untereinheit K	K00340	12,1	1.6.5.3
contig-32000012	48503	50440	NADH-Quinon Oxidoreduktase Untereinheit L	K00341	12,0	1.6.5.3
contig-32000012	47016	48503	NADH-Quinon Oxidoreduktase Untereinheit M	K00342	14,7	1.6.5.3
contig-32000012	45553	47019	NADH-Quinon Oxidoreduktase Untereinheit N	K00343	17,3	1.6.5.3
Komplex II						
contig-32	8060	9769	Succinat-Dehydrogenase/Fumarat-Reduktase, Flavoprotein Untereinheit	K00239	9,6	1.3.5.4
contig-32	7323	8051	Succinat-Dehydrogenase/Fumarat-Reduktase, Eisen-Schwefel Untereinheit	K00240	10,4	1.3.5.4
Komplex III						
contig-32000012	203033	204733	Ubiquinol-Cytochrom c Reduktase Cytochrom b	K00412	2,8	1.10.2.2

			Untereinheit			
Komplex IV						
contig-1	6060	7739	Cytochrom c Oxidase Untereinheit I	K02274	6,5	1.9.3.1
Komplex V						
contig-21	55476	56021	anorganische Pyrophosphatase	K01507	44,2	3.6.1.1
contig-0	100480	102246	V/A-type H ⁺ /Na ⁺ - transportierende ATPase Untereinheit A	K02117	25,1	3.6.3.14
contig-12	46989	49358	H ⁺ -transportierende ATPase	K01535	7,1	3.6.3.6
contig-0	99081	100478	V/A-type H ⁺ /Na ⁺ - transportierende ATPase Untereinheit B	K02118	30,5	-
contig-0	102580	103653	V/A-type H ⁺ /Na ⁺ - transportierende ATPase Untereinheit C	K02119	18,4	-
contig-0	98453	99094	V/A-type H ⁺ /Na ⁺ - transportierende ATPase Untereinheit D	K02120	30,0	-
contig-0	103650	104213	V/A-type H ⁺ /Na ⁺ - transportierende ATPase Untereinheit E	K02121	39,7	-
contig-0	102236	102574	V/A-type H ⁺ /Na ⁺ - transportierende ATPase Untereinheit F	K02122	19,9	-
contig-0	96010	97947	V/A-type H ⁺ /Na ⁺ - transportierende ATPase Untereinheit I	K02123	21,6	-
Amino Säure abbau						
contig-37	14092	15372	Glutamat-Dehydrogenase	K00261	170,7	1.4.1.3
C_DKE						
TCA						
contig-35	111336 9	111452 6	Citratsynthase	K01647	10,1	2.3.3.1
contig- 38000030	102053 0	102321 7	Aconitase	K01681	5,7	4.2.1.3
contig- 38000030	107861 0	107982 1	Isocitrat-Dehydrogenase	K00031	4,3	1.1.1.42
contig- 38000030	62409	64313	2-Oxoacid Oxidoreduktase (Ferredoxin)	K00174	18,8	1.2.7.11
contig- 38000030	64303	65229	2-Oxoacid Oxidoreduktase (Ferredoxin)	K00175	16,0	1.2.7.11
contig- 38000030	85487	86344	Succinyl-CoA Synthetase alpha Untereinheit	K01902	7,7	6.2.1.5
contig- 38000030	84379	85485	Succinyl-CoA Synthetase Untereinheit beta	K01903	9,0	6.2.1.5
contig-	842075	843796	Succinat-	K00239	9,3	1.3.5.4

38000030			Dehydrogenase/Fumarat-Reduktase, Flavoprotein Untereinheit			
contig-38000030	841326	842078	Succinat-Dehydrogenase/Fumarat-Reduktase, Eisen-Schwefel Untereinheit	K00240	9,8	1.3.5.4
contig-35	189411	190775	Fumarat-Hydratase Klasse II	K01679	3,9	4.2.1.2
contig-38000030	897362	898330	Malat-Dehydrogenase	K00024	14,2	1.1.1.37
Gluconeogenese						
contig-32000012	782120	784795	Pyruvat, Orthophosphat-Dikinase	K01006	1,6	2.7.9.1
contig-38000030	98280	100127	Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase (GTP)	K01596	0,8	4.1.1.32
contig-38000030	149582	150799	Enolase	K01689	1,6	4.2.1.11
contig-38000030	930052	931272	2,3-Bisphosphoglycerat-unabhängige Phosphoglycerat-Mutase	K15635	2,3	5.4.2.12
contig-38000030	873168	874418	Phosphoglycerat-Kinase	K00927	1,8	2.7.2.3
contig-38000030	992930	993943	Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (NAD(P))	K00150	5,5	1.2.1.59
contig-38000030	57767	58924	Fructose 1,6-bisphosphat-Aldolase/Phosphatase	K01622	4,5	4.1.2.13
contig-38000030	693941	694894	Glucose/Mannose-6-Phosphat Isomerase	K15916	3,2	5.3.1.9
contig-38000030	928613	929959	Phosphomannomutase/Phosphoglucomutase	K15778	1,7	5.4.2.2
ED						
contig-38000030	651336	652421	Glucose/Galactose 1-Dehydrogenase (NADP+)	K18124	0,4	1.1.1.360
contig-35	71306	72514	Gluconat/Galactonat-Dehydratase	K05308	8,1	4.2.1.140
contig-38000030	140106	141572	D-Glycerinaldehyd-Dehydrogenase	K18128	3,3	1.2.1.89
contig-38000030	295637	296857	Glycerat 2-Kinase	K11529	0,3	2.7.1.165
contig-38000030	107064 5	107163 7	Pyruvat-Dehydrogenase E1 Komponente alpha Untereinheit	K00161	7,6	1.2.4.1
contig-38000030	107163 4	107260 8	Pyruvat-Dehydrogenase E1 Komponente beta Untereinheit	K00162	7,0	1.2.4.1
PPP						
contig-38000030	693941	694894	Bifunktionelle Phosphoglucose/Phosphoma	K15916	3,2	5.3.1.9

			nnose-Isomerase			
contig-38000030	57767	58924	Fructose 1,6-bisphosphat-Aldolase/Phosphatase	K01622	4,5	4.1.2.13
contig-38000030	523220	524176	Transketolase	K00615	2,3	2.2.1.1
contig-38000030	524160	524831	mögliche Transaldolase	K00616	5,5	2.2.1.2
contig-38000030	105791 5	105857 1	Ribulose-Phosphat 3-Epimerase	K01783	0,8	5.1.3.1
contig-38000030	210246	210914	Ribose-5-Phosphat-Isomerase A	K01807	1,3	5.3.1.6
contig-38000030	151349	152251	Ribokinase	K00852	1,7	2.7.1.15
contig-35	219435	220289	Ribose-Phosphat-Pyrophosphokinase	K00948	1,7	2.7.6.1
contig-38000030	928613	929959	Phosphomannomutase/Phosphoglucomutase	K15778	1,7	5.4.2.2
Fettsäureabbau						
contig-38000030	308250	309950	langkettige Acyl-CoA Synthetase	K01897	0,8	6.2.1.3
contig-35	142685	143809	Acyl-CoA-Dehydrogenase	K00249	4,5	1.3.8.7
contig-38000030	111660 6	111857 3	Enoyl-CoA-Hydratase / 3-hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase	K15016	5,9	4.2.1.17
contig-35	209038	210243	Acetyl-CoA-Acetyltransferase	K00632	2,1	2.3.1.16
contig-35	79051	80313	Acetyl-CoA-Acetyltransferase	K00626	8,2	2.3.1.9
Elektronentransportkette						
Komplex I						
contig-43000032	54713	55153	NADH-Quinon Oxidoreduktase Untereinheit A	K00330	4,6	1.6.5.3
contig-43000032	55150	55614	NADH-Quinon Oxidoreduktase Untereinheit B	K00331	6,6	1.6.5.3
contig-43000032	55620	56078	NADH-Quinon Oxidoreduktase Untereinheit C	K00332	7,9	1.6.5.3
contig-43000032	56084	57205	NADH-Quinon Oxidoreduktase Untereinheit D	K00333	6,1	1.6.5.3
contig-43000032	57202	58242	NADH-Quinon Oxidoreduktase Untereinheit H	K00337	5,6	1.6.5.3
contig-43000032	58239	58679	NADH-Quinon Oxidoreduktase Untereinheit I	K00338	5,3	1.6.5.3
contig-	58917	59135	NADH-Quinon	K00339	7,8	1.6.5.3

43000032			Oxidoreduktase Untereinheit J			
contig- 43000032	59136	59435	NADH-Quinon Oxidoreduktase Untereinheit K	K00340	6,7	1.6.5.3
contig- 43000032	59437	61329	NADH-Quinon Oxidoreduktase Untereinheit L	K00341	5,9	1.6.5.3
contig- 43000032	61330	62817	NADH-Quinon Oxidoreduktase Untereinheit M	K00342	4,6	1.6.5.3
contig- 43000032	62819	64258	NADH-Quinon Oxidoreduktase Untereinheit N	K00343	4,4	1.6.5.3
Komplex II						
contig- 38000030	842075	843796	Succinat- Dehydrogenase/Fumarat- Reduktase, Flavoprotein Untereinheit	K00239	9,3	1.3.5.4
contig- 38000030	841326	842078	Succinat- Dehydrogenase/Fumarat- Reduktase, Eisen-Schwefel Untereinheit	K00240	9,8	1.3.5.4
Komplex III						
-	-	-	-	-	-	-
Komplex IV						
contig- 38000030	132228	133949	Cytochrom c Oxidase Untereinheit I	K02274	6,5	1.9.3.1
contig- 38000030	131749	132228	Cytochrom c Oxidase Untereinheit II	K02275	6,6	1.9.3.1
Komplex V						
contig- 38000030	858972	859520	anorganische Pyrophosphatase	K01507	5,6	3.6.1.1
contig- 38000030	118461 4	118697 7	H ⁺ -transportierende ATPase	K01535	0,8	3.6.3.6
contig-35	25608	27362	V/A-type H ⁺ /Na ⁺ - transportierende ATPase Untereinheit A	K02117	7,2	-
contig-35	27693	28751	V/A-type H ⁺ /Na ⁺ - transportierende ATPase Untereinheit C	K02119	5,1	-
contig-35	23562	24227	V/A-type H ⁺ /Na ⁺ - transportierende ATPase Untereinheit D	K02120	7,2	-
contig-35	27367	27696	V/A-type H ⁺ /Na ⁺ - transportierende ATPase Untereinheit F	K02122	6,9	-
contig-35	21196	23124	V/A-type H ⁺ /Na ⁺ - transportierende ATPase Untereinheit I	K02123	4,5	-

Cytochrom bd Komplex						
contig-38000030	728449	729816	Cytochrom d Ubiquinol-Oxidase Untereinheit I	K00425	1,3	1.10.3.14
Amino Säure abbau						
contig-38000030	202896	204146	Glutamate-Dehydrogenase	K00261	66,0	1.4.1.3

Tab. A-6: Lister der 20 höchst exprimierten Gene von A_DKE, B_DKE und C_DKE. Ausgenommen sind ribosomale Proteine.

A_DKE		B_DKE		C_DKE	
Genbeschreibung	RPKM	Genbeschreibung	RPKM	Genbeschreibung	RPKM
Translations-Initiationsfaktor IF-2 Untereinheit beta	218	HD Domäne Protein	2061	Zink-haltiges Ferredoxin	73
hypothetisches Protein	137	bakterielles extrazelluläres lösliche Stoffe bindendes Protein	897	Glutamat-Dehydrogenase	66
hypothetisches Protein	93	Replikationsfaktor A1	270	Replikationsfaktor A1	61
hypothetisches Protein	82	DNA-bindendes Protein HTa	248	4-Aminobutyrat-Aminotransferase	46
hypothetisches Protein	74	Superoxiddismutase, Fe-Mn Familie	194	hypothetisches Protein	44
hypothetisches Protein	61	Ornithin-Cyclodeaminase	175	Programmierter Zelltod Protein 5	30
hypothetisches Protein	60	Thermosom Untereinheit beta	173	DNA-bindendes Protein HTa	27
hypothetisches Protein	52	Zink-haltiges Ferredoxin	171	sec-unabhängiges Protein Translokase Protein TatA	26
hypothetisches Protein	49	Glutamat-Dehydrogenase	171	Elongationsfaktor 1-alpha	25
hypothetisches Protein	47	mögliches Membranprotein	151	bakterielles extrazelluläres lösliche Stoffe bindendes Protein	25
abstammungsspezifisches thermisches Regulatorprotein	46	hypothetisches Protein	143	hypothetisches Protein	22
hypothetisches Protein	42	Proteasom alpha Untereinheit	142	Eisenkomplexbesitzendes system-bindendes Protein	21
Translations-Initiationsfaktor IF-2 Untereinheit beta	40	hypothetisches Protein	142	hypothetisches Protein	21
hypothetisches Protein	34	möglicher HTH-Typ Transkriptionsregulator	135	hypothetisches Protein	21
Thioredoxin	33	archaeelles Flagellenprotein FlaC	130	mögliches Peroxiredoxin	20

hypothetisches Protein	30	Ribonucleosid-diphosphat-Reduktase alpha Kette	130	2-Oxoacid-Ferredoxin-Oxidoreduktase Untereinheit alpha	19
PRC-barrel Domäne Protein	30	Carboxymuconolacton-Decarboxylase Familienprotein	130	universales Stressprotein	19
hypothetisches Protein	26	Elongationsfaktor 1-alpha	129	Cytochrom C Oxidase Untereinheit II	18
hypothetisches Protein	24	hypothetisches Protein	126	Elongationsfaktor 1-beta	18
Isopentenyl-Phosphat-Kinase	22	hypothetisches Protein	123	Superoxiddismutase, Fe-Mn Familie	18

Characterisation of a stable laboratory co-culture of acidophilic nanoorganisms

Susanne Krause [1], Andreas Bremges [3,4], Philipp C. Münch [3,5], Alice C. McHardy [3] and Johannes Gescher* [1,2]

[1] Department of Applied Biology, Karlsruhe Institute of Technology (KIT), Karlsruhe, Germany

[2] Institute for Biological Interfaces, Karlsruhe Institute of Technology (KIT), Eggenstein-Leopoldshafen, Germany

[3] Computational Biology of Infection Research, Helmholtz Centre for Infection Research, Braunschweig, Germany

[4] German Center for Infection Research (DZIF), partner site Hannover-Braunschweig, Braunschweig, Germany

[5] Max von Pettenkofer-Institute of Hygiene and Medical Microbiology, Ludwig-Maximilians-University of Munich, Munich, Germany

Corresponding author:
Prof. Dr. Johannes Gescher
Karlsruhe Institute of Technology
Institute of Applied Biosciences
Department of applied biology
Phone: ++49721-608-41940
FAX: ++49721-608-41941
E-mail: johannes.gescher@kit.edu

This study describes the laboratory cultivation of ARMAN (Archaeal Richmond Mine Acidophilic Nanoorganisms). After 2.5 years of successive transfers in an anoxic medium containing ferric sulfate as an electron acceptor, a consortium was attained that is comprised of two members of the order *Thermoplasmatales*, a member of a proposed ARMAN group, as well as a fungus. The 16S rRNA identity of one archaeon is only 91.6% compared to the most closely related isolate *Thermogymnomonas acidicola*. Hence, this organism is the first member of a new genus. The enrichment culture is dominated by this microorganism and the ARMAN. The third archaeon in the community seems to be present in minor quantities and has a 100% 16S rRNA identity to the recently isolated *Cuniculiplasma divulgatum*. The enriched ARMAN species is most probably incapable of sugar metabolism because the key genes for sugar catabolism and anabolism could not be identified in the metagenome. Metatranscriptomic analysis suggests that the TCA cycle funneled with amino acids is the main metabolic pathway used by the archaea of the community. Microscopic analysis revealed that growth of the ARMAN is supported by the formation of cell aggregates. These might enable feeding of the ARMAN by or on other community members.

Introduction

The question of the smallest autonomous living cell is an intensely discussed topic in microbiology. In 1999, the Steering Group for the Workshop on Size Limits of Very Small Microorganisms defined the lower theoretical limit for an autonomous living cell inhabiting all necessary components to 0.008 - 0.014 μm^3 (Steering Group for the Workshop on Size Limits of Very Small Microorganisms, National Research Council, 1999). Early findings of ultra-small microorganisms, e.g. “ultramicrobacteria” in seawater (Torrella and Morita, 1981) and “dwarf cells” or “nanobacteria” in soils (Bae *et al.*, 1972; Folk, 1993), and the question of the potential medical relevance (Kajander and Ciftcioglu, 1998) of some of these cells were the starting point and motivation for a new research direction. Nevertheless, some of these nanobacteria were questioned later for being microcrystalline apatite (Cisar *et al.*, 2000) or microbial starvation forms (Kjelleberg, 1993). Still, there are several organisms with cell sizes close to or even below the mentioned theoretical limit that were identified in different habitats in the last century.

Filtration of water samples with 0.2 or 0.1 μm filters and subsequent sequencing of the 16S rRNA genes of the organisms has revealed that the enriched small or ultra-small microbes belong to candidate divisions that are widespread in nature but lack any cultured representative (Miyoshi *et al.*, 2005) (Luef *et al.*, 2015). Luef *et al.* (2015) even hypothesized that it might be a general characteristic of previously uncultivable bacterial phyla that the organisms belonging to these phyla are small (Luef *et al.*, 2015). Thus far, isolated ultramicrobacteria belong to different phyla including *Actinobacteria* (Hahn *et al.*, 2003), *Bacteroidetes* (Suzina *et al.*, 2011) or *Alphaproteobacteria* (Rappé *et al.*, 2002; Duda *et al.*, 2009). They have cell volumes

between $<0.1 \mu\text{m}^3$ and $<0.004 \mu\text{m}^3$, and their energy metabolism is described as chemoorganotrophic, heterotrophic or facultatively parasitic. Nevertheless, detailed information about optimal growth conditions, ecological role and corresponding genomic or transcriptomic data are often not available.

Nanoarchaeum equitans and the recently cultured “*Nanopusillus acidilobi*” are the only ultra-small archaea that have been cultivated and characterized under laboratory conditions so far. The genome of *N. equitans* is only ~ 0.5 Mbp in size. It lacks nearly all genes essential for primary biosynthesis as well as the central and energy metabolism (Waters *et al.*, 2003), which indicates a strong dependency on its host *Ignicoccus hospitalis*. Interestingly, *I. hospitalis* cells do not divide if more than two *N. equitans* cells infect them. Still, generation time and final cell densities of *I. hospitalis* are not affected by infection (Jahn *et al.*, 2008). Despite the absence of detectable damage or genomic regulatory changes to its host, *N. equitans* is described as a nutritional parasite (Giannone *et al.*, 2015). Like *N. equitans*, “*Nanopusillus acidilobi*” is an obligate ecto-symbiont or parasite with a reduced genome (~ 0.6 kbp). It lacks the majority of the necessary genetic information for energy metabolism and primary biosynthetic pathways except for several genes encoding proteins that are putatively involved in glycolysis and gluconeogenesis (Wurch *et al.*, 2016).

The genomes of members of the not yet isolated Archaeal Richmond Mine Acidophilic Nanoorganisms (ARMAN) are ~ 0.5 Mbp larger than the genomes of *N. equitans* and “*N. acidilobi*”. They contain the necessary information for key functions of a central carbon metabolism (Baker *et al.*, 2010). This is indicative of a more independent lifestyle. The ARMAN were first detected by Baker *et al.* in 2006 (Baker *et al.*, 2006). Since then, five

different ARMAN groups (ARMAN-1 to ARMAN-5) were found in acidophilic biofilms that thrive at the Richmond Mine localized at the Iron Mountains in California (Baker *et al.*, 2010). ARMAN-1 and -2 belong to the phylum *Micrarchaeota*, while groups -4 and -5 are part of the *Parvarchaeota*. The phylogenetic position of ARMAN-3 is not known, since a 16S rRNA gene sequence is not available so far. The organisms are ellipsoid cells with volumes of $0.009 \mu\text{m}^3$ to $0.04 \mu\text{m}^3$ and are surrounded by a cell wall. The average number of ribosomes that were detected per cell was only 92. Furthermore, most cells have enigmatic tubular structures of unknown function (Comolli *et al.*, 2009). Genomic and proteomic data assembled from metagenomes of ARMAN-2, -4 and -5 revealed that the organisms have a complete or nearly complete tricarboxylic acid cycle, but that only ARMAN-4 and -5 have further genes for glycolytic pathways, the pentose phosphate pathway, and glycerol utilization (Baker *et al.*, 2010).

Still, the overall metabolism of the organisms, as well as the question of a putative dependency on other community members remain unclear. Moreover, prediction of the physiological capabilities of the ARMAN is highly complex if not even momentarily impossible since 25-38% of the predicted genes do not match sequences in public databases. Nevertheless, ARMAN are prominent members of submerged acid mine drainage (AMD) biofilms especially in anoxic parts (Justice *et al.*, 2012), which indicates a prominent role within these biocoenoses.

The 16S rRNA genes of ARMAN were also found in other ecosystems affected by AMD (Amaral-Zettler *et al.*, 2011; Méndez-García *et al.*, 2014). One of these is the former pyrite mine “Drei Kronen und Ehrt” in the Harz Mountains in Germany. Here, the microorganisms are embedded in gel-like biofilms, which resemble stalactite-formations (Ziegler *et al.*, 2009). These biofilms grow at average pH values of 2.0 to 2.5

and are characterized by an outer oxic rim and an inner anoxic core. The rim of the biofilm is mostly composed of chemolithoautotrophic bacteria that thrive using ferrous iron as energy and electron source and oxygen as electron acceptor. The anoxic center contains several different acidophilic archaea including ARMAN(Ziegler *et al.*, 2013).

This study describes the enrichment of ARMAN from biofilms of the “Drei Kronen und Ehrt” mine and the physiological, metagenomic and metatranscriptomic analysis of the enrichment culture. With long-term selective culturing experiments, it was possible to obtain very low diversity enrichment cultures of ARMAN. These are dominated by a not-yet cultured member of the *Thermoplasmatales* and an ARMAN-1 related organism. Analyses of the enrichment cultures as well as metagenomic and metatranscriptomic data offer new insights into the lifestyle of the previously uncultured ARMAN as well as two novel members of the *Thermoplasmatales*.

Results and Discussion

Enrichment process

In 2013, Ziegler *et al.* described stalactite like biofilms that grow on the ceiling of an abundant pyrite mine in the Harz mountains in Germany (Ziegler *et al.*, 2013). Organisms belonging to the ARMAN as well as members of the *Thermoplasmatales* were detected within the anoxic core of the biofilms. The goal of this study was to produce a pure or at least highly enriched ARMAN culture to understand potential ecological dependencies of the organisms. Hence, the enrichment process used an anoxic medium containing casein and yeast extract as surrogates for biomass formed by chemolithoautotrophic primary producers of the biofilms. Furthermore, ferric sulfate was added as potential electron acceptor because iron and sulfate were prominent members of the water dripping from the biofilms (Ziegler *et al.*, 2009). Finally, the headspace of the hungate tubes was flushed with a hydrogen/carbon dioxide mixture (80%/20%) because there was also evidence for potential methanogenic activity in the biofilm, which could be supported by the release of hydrogen from fermentative microorganisms. A mixture of four antibiotics was added to select for archaeal growth. After 1.5 years, bacteria could no longer be observed using CARD-FISH or PCR-analysis. Hence, the addition of antibiotics was omitted from this point onward.

After 2.5 years, the cultures showed a rather stable behavior and could be transferred every 10 weeks. Ferric iron reduction could be observed using the ferrozine assay within the individual growth intervals of the cultures. Moreover, addition of ferric sulfate was necessary for archaeal growth. Therefore, dissimilatory iron reduction seems to be an important trait of at least one member of the archaeal community. At this point, CARD-FISH analysis revealed the presence of archaea, ARMAN and a fungus (Supplementary Figure S1). Of note, the archaea probe does not hybridize to ARMAN

species, which indicates the presence of at least one other archaeal species in the enrichment.

Metagenome and phylogenetic analysis

We could reconstruct the genomes of three different archaea. Hence the CARD-FISH analysis using the archaea probe displayed the presence of two different organisms. Supplementary Figure S2 shows the taxonomic profiles for metagenomes determined with Taxator-tk(Droege *et al.*, 2015). These profiles corroborate the CARD-FISH results and reveal that the majority of the available sequence (~80%) can be assigned to the archaea, while the remaining part cannot be assigned to a taxonomic group. Unfortunately, we could not find clear evidence for DNA or RNA that could be assigned to the fungus in the enrichment cultures, possibly because the fungus was underrepresented at the point of sampling and due to the robust cell structure, which might have hampered DNA-isolation. The sequence data suggests a community that consists predominantly of a novel member of the *Thermoplasmatales* which is most closely related to *Thermogymnomonas acidicola* (91.6% identity, 1206 bp) and *Cuniculiplasma divulgatum* (91.7% identity, 1206 bp) (Supplementary Table S1 shows an overview of most closely related sequences). Moreover, an organism belonging to the ARMAN group was identified. Surprisingly, the ARMAN 16S rRNA gene sequence had a 99% identity to a sequence belonging to the ARMAN-1 group that was obtained from samples collected at the Iron Mountains in California (USA) by Baker *et al.* in 2006(Baker *et al.*, 2006). A third and minor represented genome was also detected (Figure 1). The 16S rRNA gene sequence within this part of the metagenome was identical to the published sequence of the recently isolated *C. divulgatum*(Olga V Golyshina *et al.*, 2016) and Gplasma, one member of the alphabet-plasmas(Yelton *et al.*,

2013). Hence, it seems that three archaea and a fungus together form the stable consortium that was isolated over 2.5 years of successive transfers.

In the following sections, we will refer to the ARMAN-1 organism as A_DKE (ARMAN_Drei_Kronen_und_Ehrt), to the novel member of the *Thermoplasmatales* as B_DKE and to the organism with the perfect match to the 16S rRNA gene sequence of *C. divulgatum* as C_DKE (*Cuniculiplasma_Drei_Kronen_und_Ehrt*). We estimated the completeness for genome bins recovered from the metagenome samples and obtained values of 82% for A_DKE, 99% for B_DKE and 86% for C_DKE (Supplementary Table S2). Of note, all available ARMAN-related genomes known to date have a rather low predicted genome completeness by means of CheckM. This could indicate that ARMANs lack certain genes previously assumed to be present in all archaea. Hence, the completeness of the assembled ARMAN genome is probably higher than 82%. The expected genome sizes of the three organisms are 1, 1.9 and 1.6 Mbp, respectively.

Using the genomic sequences, we sought to determine differences in the occurrences of gene families between A/B/C_DKE and also in comparison to available ARMAN sequences and genomes of six related members of the *Thermoplasmatales* (*Thermoplasma volcanium*, *T. acidophilum*, *Thermogymnomonas acidicola*, *Picrophilus torridus*, *Ferroplasma acidarmanus* and *Cuniculiplasma divulgatum* S5) (Figure 2). It is probably not surprising that there were significant differences in the overall number of gene families (Figure 2a). Moreover, significant differences were detected within a number of functional gene families annotated as translation, amino acid metabolism and metabolism of cofactor and vitamins among others (Figure 2b, Supplementary Table S3) (based on a two-sided Fisher's exact test, $P=1.9E-8$, $3.6E-8$ and $5.0E-6$, respectively).

A_DKE and comparison to other ARMAN genomes. ARMAN genomes contain on average 1009 \pm 69 gene families (Figure 2a). Within the ARMAN genomes, significant differences were detected in several functional gene families annotated as translation, amino acid metabolism and metabolism of cofactor and vitamins among others (Figure 3b). Within the four ARMAN genomes, we identified 228 gene families that together build the core genome. The A_DKE can be differentiated from the other sequenced ARMAN species by 227 unique gene families compared to 9 unique gene families shared by ARMAN-2, -4 and -5 (Figure 3c). We found that 15 of these 227 unique gene families could be successfully annotated (Supplementary Table S5). Compared to the other three ARMAN species, the genome of A_DKE shows more genes related to benzoate degradation, the phosphotransferase system, the metabolism of aromatic compounds as well as amino acid metabolism and degradation (Figure 3b). Based on the 16S rRNA genes, A_DKE seems to be most closely related to ARMAN-2. This was also corroborated by further comparative genome analysis (Fig. 3). The GC-content of ARMAN-2 is rather similar to A_DKE, while ARMAN-4 and -5 share lower GC values. Furthermore, the number of similar genes – defined by expected E-values lower $1e-100$ – also seems to cluster A_DKE with ARMAN-2 while ARMAN-4 and ARMAN-5 build via that analysis a second group (Figure 3a). Using an automated assignment of genes to central metabolic pathways using the KEGG database we could highlight the presence and similarity within and between the different ARMAN genomes. It seems that all organisms share a similar set of genes involved in the citric acid cycle and in respiration. In contrary, genes involved in glycolysis/gluconeogenesis, the pentose phosphate pathway, the Entner-Doudoroff pathway or the β -oxidation are not as similar and wide spread within the genomes of the organisms.

Overall, the genome of A_DKE differs from previously sequenced ARMAN species in terms of sugar metabolism. Baker *et al.* (2010) described a pentose phosphate pathway for ARMAN-4 and -5 and an incomplete glycolysis for ARMAN-2 (Baker *et al.*, 2010). In contrast, we could not identify genes encoding the necessary enzymes for the conversion of glucose to pyruvate. Moreover, we could identify only two potential genes that could be involved in the pentose phosphate pathway. Moreover, the genes encoding for key reactions of the ED pathway were not detectable (Supplementary Table S6). Hence, there seems to be a necessity for the uptake of hexose and pentose sugars from the environment. Furthermore, a β -oxidation of fatty acids seems to be not possible, since the genome contains only genes for a 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase and an acetyl-CoA thiolase. In contrary, we detected genes for a complete tricarboxylic acid cycle (TCA), with the exception that bioinformatic analysis revealed so far only one subunit of the succinyl-CoA synthetase in A_DKE. Archaeal electron transport complexes can have unusual compositions (Schäfer *et al.*, 1999). Nevertheless, bioinformatic analysis predicts so far only the existence of a NADH-dehydrogenase, a respiratory succinate-dehydrogenase and an ATP-synthase in the ARMAN genome. Hence, it is not clear how the energy metabolism of the organism might function. While the citric acid cycle would be a way to produce ATP/GTP, it also leads to the production of reducing-equivalents. How these reducing equivalents are transported to an electron acceptor and what this electron acceptor might be is not clear so far. Our data suggest an anoxic life style. Evidence for fermentative pathways was not found. Hence, we must assume that the organism can use either ferric iron and/or sulfate as electron acceptor (the only electron acceptors present in the medium) or that it can conduct an interspecies electron transfer to one of the other community members. Therefore, we must also assume that ARMAN species might have evolved novel components for respiratory

electron transfer that are currently not detectable by bioinformatics analyses and will necessitate biochemical analysis for characterisation.

B_ and C_DKE. A dendrogram based upon the hierarchical clustering of gene families shared between genomes of five related members of the *Thermoplasmales* (Figure 2c) reveals that B_DKE and C_DKE cluster together with *T. acidicola*. The core genomes of the selected *Thermoplasmales* seem to consist of 624 gene families while the overall average number of detected gene families was 1,935 +/- 557. A search for unique gene families (Figure 4c, Supplementary Table S7) in B_DKE compared to C_DKE revealed 914 gene families. Most of these were annotated as ABC transporters, two-component systems or as involved in the oxidative phosphorylation (more abundant in B_DKE) (Figure 4b). Comparative genome analysis corroborates the identity of the 16S rRNA genes of *C. divulgatum* and C_DKE. This similarity can also be observed on the genome level since most of the genes of *C. divulgatum* have a similar counterpart in C_DKE (Figure 4a). In contrary, the genome of B_DKE contains several areas with a rather low number of similar genes compared to C_DKE, *C. divulgatum* and *T. acidicola*. As expected, the genomes of the 4 members of the *Thermoplasmales* have overall a low percentage of genes with hypothetical function compared to the ARMAN genomes (Figure 3a).

Both B_ and C_DKE contain all necessary enzymes for pentose formation via the non-oxidative pentose phosphate pathway similar to other members of *Thermoplasmales* (Bräsen *et al.*, 2014) (Supplementary Table S6). Furthermore, the genome of B_DKE contains nearly all enzymes for the branched ED pathway including the key enzyme bifunctional KDG-/KDPG-aldolase. Nevertheless, we could not find a corresponding gene to a KDG-kinase. The genome of C_DKE shows all enzymes of the

non-phosphorylated variant of the ED except its key enzyme, the KDG-aldolase. Nevertheless, a complete non-phosphorylative ED was detected in the genome of *Gplasma* (Yelton *et al.*, 2013) and other members of the *Thermoplasmatales* like *Thermoplasma acidophilum* (Budgen and Danson, 1986) or *Picrophilus torridus* (Reher *et al.*, 2010). Hence, this potential lack of pathways for the catabolism of sugar compounds is not a general characteristic of similar organisms.

Sugar degradation catalyzed by the two *Thermoplasmatales* members via glycolysis can be excluded since both genomes lack evidence for an encoded phosphofructokinase, which corresponds well with the genomic data of *C. divulgatum* (Olga V. Golyshina *et al.*, 2016). Still, B_DKE and C_DKE show all enzymes for gluconeogenesis, with the exception of the fructose 1,6-bisphosphate (FBP) aldolase. Nevertheless, a corresponding gene for this enzyme is missing in most archaeal genomes including *Thermoplasma acidophilum* (Ruepp *et al.*, 2000) and *Picrophilus torridus* (Fütterer *et al.*, 2004). Results by Say and Fuchs (2010) revealed the presence of a bifunctional FBP aldolase-phosphatase with high FBP aldolase and FBP phosphatase activity, which guarantees an unidirectional gluconeogenesis pathway (Say and Fuchs, 2010). This exists in nearly all archaeal groups and may be the putative ancestral gluconeogenic enzyme. A corresponding gene was found in the genomes of B_DKE and C_DKE, which likely allows both organisms to produce sugar compounds. The key enzyme for glycolysis, the phosphofructokinase, is missing also in the genomic data of *Gplasma*, whereas a bifunctional FBP aldolase-phosphatase is detectable (Yelton *et al.*, 2013).

B_ and C_DKE contain the genes for a complete tricarboxylic acid cycle (TCA). In contrast, genomic analyses of *C. divulgatum* PM4 and S5 revealed that 2-oxoglutarate dehydrogenase, fumarate reductase and fumarase might be missing (Olga V. Golyshina *et al.*, 2016). Nevertheless, Golyshina *et al.* point out that these enzyme functions could be

functionally replaced by enzymes catalyzing closely related reactions that were predicted by bioinformatic analysis. The presence of succinate dehydrogenase/fumarate reductase and 2-oxoglutarate/2-oxoacid ferredoxin oxidoreductase could also be evidence for the presence of a reverse TCA cycle in the three enriched archaea. Still, the ATP citrate lyase—the third indicator gene for the reverse TCA—is missing in all three genomes. Similar to the DKE_A genome, C_DKE and B_DKE do not seem to possess a complete β -oxidation pathway. While a β -hydroxyacyl-CoA dehydrogenase was not detectable in C_DKE, B_DKE does not seem to have β -hydroxyacyl-CoA dehydratase and dehydrogenase genes.

Bioinformatic analysis predicts also in B_ and C_DKE the existence of a NADH-dehydrogenase, a respiratory succinate-dehydrogenase and an ATP-synthase. Furthermore, B_DKE and C_DKE contain corresponding genes for a cytochrome c-oxidase although genetic evidence for a cytochrome c protein is lacking. Both contain a Rieske FeS protein that is a characteristic component of complex III and it forms a gene cluster in B_DKE with a cytochrome b_6 -like protein that could have complex III function (Schäfer *et al.*, 1999). In addition, at least B_DKE has a gene which most probably encodes a copper protein belonging to the plastocyanin/azurin family, which could functionally replace cytochrome c (Schäfer *et al.*, 1999). We currently do not know how this electron transport core chain might be connected to ferric iron reduction, which is catalyzed at least by B_DKE within the community (see below). Furthermore, we detected in C_DKE only a potential part of complex III and no cytochrome c gene. Hence, it is unknown whether the latter might be a remnant of genomic reduction and selection towards a shorter electron transport chain involving only complex I and a cytochrome ubiquinol oxidase.

Metatranscriptome

The ratio of sequence reads that can be referred to B_DKE, A_DKE and C_DKE is 1:0.5:0.27. Hence, all three archaea considerably contribute to the overall metatranscriptome of the study. The high content of RNA sequences that can be referred to A_DKE is surprising because all previous studies on ARMAN revealed a remarkably small number of ribosomes and because — as will be shown later — the number of ARMAN cells within the community is lower than the sum of B_DKE und C_DKE. We suggest that the considerably high content of A_DKE RNA within the metatranscriptome is evidence for active growth of the majority of ARMAN cells at sampling.

In **A_DKE**, 14 of the 20 most highly expressed genes encode for hypothetical proteins, which hampers the prediction of potential metabolic reactions that sustain growth of the organism. Nevertheless, the data suggests that at least glutamate could be a carbon and energy source for the organism. The glutamate dehydrogenase gene (*gdh*) is relatively high expressed (Figure 5). The corresponding enzyme catalyzes the conversion of glutamate to 2-oxoglutarate, an intermediate of the citric acid cycle. Furthermore, transcripts could be identified for all detected genes of the citric acid cycle. Furthermore, complex I and V of the respiratory chain are expressed.

Similarly to A_DKE, the *gdh* gene is also highly expressed in **B_DKE and C_DKE**. In agreement with this, it can be observed in both transcriptomes that genes for TCA cycle enzymes are more highly expressed relative to the ED pathway (Figure 5). The question about the variant of the ED remains unclear, because B_DKE expresses the 2-dehydro-3-deoxy-(phospho)gluconate (KD(P)G) aldolase as well as all enzymes for the non-phosphorylated variant of the ED and the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

(GAPN) that is involved in the semi-phosphorylated variant of the pathway and could not be detected in other members of the *Thermoplasmales* (Bräsen *et al.*, 2014). The C_DKE and B_DKE also express the complete set of genes necessary for gluconeogenesis and the pentose phosphate pathway. Furthermore, all detected genes encoding for electron transfer processes are highly expressed.

An analysis of the 20 most highly expressed genes (Supplementary Table S8) showed that both *Thermoplasmales* species have high expression rates for oxidative stress proteins as well as proteins linked to electron transport process. Glutamate dehydrogenase and 2-oxoacid ferredoxin oxidoreductase are also highly expressed in C_DKE. The detected high expression rates for oxidative stress proteins could be due to the presence of trace amounts of oxygen during the cultivation, which would also indicate that oxygen could be a potential electron acceptor for the organisms. Hence, growth experiments were conducted within a glove box containing a 95% N₂/5% H₂ atmosphere. If it all, we saw slower growth of the fungus within the enrichment culture. The archaea did not seem to be affected by the strictly anoxic conditions (data not shown).

Enrichment of B_DKE and isolation of the fungus

Interestingly, omitting the addition of antibiotics lead in some cultures to an increased growth rate of DKE_B. This resulted in cultures containing only B_DKE and the fungus. The fungus was isolated from these cultures using a solidified medium described by Baker *et al.* (2004) (Baker *et al.*, 2004). Fungal colonies on these plates were used for phylogenetic analysis using a primer set for ITS amplification. The phylogenetic classification of the 5.8S rRNA gene and relating ITS-DNA sequences of the fungus

revealed a 99% identity to *Acidothrix acidophila*, which is an acidophilic fungus isolated from acidic soils in the Czech Republic (Hujšlová *et al.*, 2014). Of note, growth of the fungus in the medium used for the enrichment process did not lead to a reduction of the ferric sulfate. In contrary, growth of a culture containing only the fungus and B_DKE was connected to ferric sulfate reduction. Hence, B_DKE is capable of ferric iron reduction.

Timeline experiments

The dynamics and interactions within the enrichment cultures were analyzed via timeline experiments. Hence, triplicate cultures were analyzed over eleven weeks of growth. The cultures were fixed for CARD-FISH analyses twice weekly, and DNA was isolated for qPCR-based quantitative community analyses once a week. Furthermore, samples were taken for measurements of ferric iron reduction as well as control of the pH values every week. Of note, as was emphasized before, we do not have genetic information regarding the fungus so far. Therefore, we could not conclude with certainty from gene to cell quantities. Hence, the qPCR analysis was conducted only with the archaeal members of the consortium.

Analysis of the qPCR and CARD-FISH data revealed a rather similar growth behavior of A_DKE as well as B_DKE and C_DKE (Figure 6). In the lag phase, the cell numbers increased continuously with a slightly higher amount of A_DKE cells compared to that of B_DKE and C_DKE. By week six, all organisms seemed to enter the logarithmic growth phase. From this point on, B_DKE and C_DKE began to dominate the cultures. The highest cell concentrations were reached in week eight. Thereafter, a rapid decrease in cell numbers was detected. The CARD-FISH pictures also highlight that A_DKE cells are mostly part of B_DKE or C_DKE cell agglomerates. Assuming that agglomerates are formed by extracellular polymeric material, which usually consists to a large fraction out

of sugar compounds, we speculated that the biofilm growth might ensure the access to sugar for A_DKE. We emphasized in the previous section that some cultures showed faster growth during the conducted transfers and that these cultures were composed only of B_DKE and the fungus. These cultures do not show growth in the form of flocks but rather are uniform planktonic cells. Hence, the change in the growth phenotype might be the reason for decreasing A_DKE cell numbers. Supplementary Figure S3 displays the difference between the two growth phenotypes of B_DKE.

Interestingly, the ferrous iron concentrations as well as the measured pH values correlate with the growth curve data (Figure 6). Until week six, only a slightly increased content of ferrous iron could be measured, and the pH values remained constant. From week seven on, there was a rapid ferric iron reduction along with increased growth rates. Even the pH values showed a slight decrease from this point on representing the acidification associated with the ferric iron reduction.

Conclusion

We established a highly enriched consortium consisting of two acidophilic *Thermoplasmatales* species, an ARMAN, and a fungus. Of note, this is the only stable enrichment culture described so far containing ARMAN organisms. During the course of writing this manuscript, it was possible to obtain a culture that is composed only of A_DKE, B_DKE and the fungus (data not shown). Hence, we cannot say whether a specific archaeon is necessary to sustain growth of the ARMAN, but at least the interaction with B_DKE seems to be sufficient.

The cultivated ARMAN-1 has a complete or nearly complete TCA cycle and lacks nearly all enzymes necessary for glycolysis/glyconeogenesis and the pentose phosphate pathway. Moreover, we could not find evidence for gluconeogenesis and the pentosephosphate pathway, suggesting a dependency on synthesis of hexose and pentose sugars by other community members. This dependency seems to be corroborated by the identification of ARMAN cells within biofilm flocks that are likely built primarily by B_DKE. The colocalization of the cells might simplify access to suitable carbohydrates for the ARMAN. At least B_DKE seem to thrive using a respiratory metabolism with ferric iron as electron acceptor. Very recently, the sequence of another ARMAN-1 genome was published (Burstein *et al.*, 2017). It will be interesting to study differences in the genomes obtained from the US and German field sites in future studies.

We tried to exclude oxygen from the growth medium and measurements of the oxygen content of the cultures by an optode suggest an anaerobic lifestyle. Moreover, similar growth of the archaea was also observed in an anoxic glove box. The relatively high expression levels of genes corresponding to enzymes involved in the elimination of oxidative stress might be due to the relatively short exposure to oxygen at the point of

RNA sampling. In future experiments, we will combine heat inactivated B_DKE/fungus extracts with filtration based selection for pure ARMAN cultures. Nevertheless, B_DKE cells are also very small and pleomorphic, and the doubling time of the organisms is rather low. Hence, although future experiments seem straight forward they will require months or years of incubation time for several necessary culture transfers.

Experimental Procedures

Culturing conditions

Enrichment cultures of *Thermoplasma* spp. and ARMAN-1 originate from acidophilic stalactite-like biofilms of the former pyrite-mine “Drei Kronen und Ehrt” in the Harz Mountains, Germany (Ziegler *et al.* 2009 and 2013). Biofilms were inoculated under anoxic conditions in Hungate tubes and in a medium originally designed for the isolation of *Picrophilus* species (Huber and Stetter, 2001). The pH of the medium was adjusted to 2.5 using 0.5 M H₂SO₄. Afterwards, the medium was autoclaved and supplemented with sterile filtered solutions of yeast extract, casein and ferric sulfate to final concentrations of 0.1% each and 20 mM, respectively, as critical additives. The growth of the bacterial species was repressed with 150 µg ml⁻¹ streptomycin, 50 µg ml⁻¹ kanamycin, 30 µg ml⁻¹ chloramphenicol and 2 µg ml⁻¹ vancomycin. The headspace was flushed with an 80% H₂/CO₂ 20% gas mixture. Cultures were inoculated with 10% of a growing co-culture and incubated at 22°C. *Escherichia coli* cells were routinely cultured in LB medium supplemented with 40 µg ml⁻¹ kanamycin or 100 µg ml⁻¹ ampicillin, if necessary. Isolation of a fungus was conducted with a medium based on the study by Baker *et al.* (2004)(Baker *et al.*, 2004). The pH of the medium was adjusted to 2 using 0.5 M H₂SO₄ and it was supplemented with SL10 trace elements (DSMZ medium 320). The media plates were prepared with the addition of 2 % (w/v) agar.

CARD-FISH

Samples were fixed for 1 h in 4% paraformaldehyde, washed twice in phosphate-buffered saline (PBS) and stored at -20°C in 50:50 PBS/ethanol. The fixed cells were hybridized and amplified as described previously (Pernthaler *et al.*, 2004; Ziegler *et al.*, 2013). The following HRP-labelled 16S rDNA probes were used: ARCH915 (Archaea

domain, GTG CTC CCC CGC CAA TTC CT, 20% formamide; Stahl and Amann, 1991) and ARM980 (ARMAN, GCC GTC GCT TCT GGT AAT, 30 % formamide; Baker *et al.*, 2006)). For amplification, Alexa⁵⁴⁶ and Alexa⁴⁸⁸ were used and counterstaining was conducted with DAPI. Samples were viewed on a Leica DM 5500B microscope (object lens 100x: HCX PL FLUOTAR, 1.4, oil immersion; eyepiece 10x: HC PLAN s (25) M), and images were taken with a Leica DFC 360 FX camera and the corresponding Leica LAS AF Lite software.

Ferrous iron quantification

Ferric iron reduction was determined by quantification of the ferrous iron content spectrophotometrically using the ferrozine assay as described previously (Stookey, 1970).

Isolation of fungal DNA and amplification

A protocol based on Cenis (1992)(Cenis, 1992) was used to isolate DNA from the fungus. For taxonomic classification, the internal transcribed spacer (ITS) region primers ITS1 and ITS4(White *et al.*, 1990) were used to amplify the DNA with the iProof™ High-Fidelity PCR Kit (Bio-Rad, Munich, Germany).

Quantification of cells using quantitative PCR

Quantitative PCR was used to quantify growth of the archaeal species in the enrichment culture. Standard curves were developed by integrating plasmids containing the target sequences of the qPCR primer sets in the genome of *E. coli*. Primer sets were developed for the 23S rRNA gene of ARMAN-1 and the 23S rRNA of the two *Thermoplasma* spp. using NCBI/Primer-BLAST(Ye *et al.*, 2012) as described in the supplemental information. The primer sequences are listed in Supplementary Table S9.

The organisms could contain more than one copy of the 23S rRNA gene, and this would hamper quantitative analysis. Thus, the normalized per-sample coverage of all genes was compared to the 23S rRNA gene coverage. The latter was always below the overall coverage (Supplementary Table S10). Hence, the assumption was made that the 23S rRNA was represented by one copy in the genome.

DNA/RNA isolation for metagenomics/metatranscriptomics

Isolation of genomic DNA for metagenomic analysis was conducted according to Lo *et al.* (2007)(Lo *et al.*, 2007). The total RNA isolation was conducted according to the protocol of the TRIzol Max Bacterial RNA Isolation Kit (Thermo Fisher, Waltham, USA) with 8 ml of an enrichment culture as the starting material. The remaining DNA was hydrolyzed with the DNA-free™ DNA Removal Kit (Thermo Fisher, Waltham, USA) following the manufacturer's instructions.

Metagenomic/metatranscriptomic sequencing and analyses

Metagenomic DNA from two analogous enrichment cultures was used for Illumina-based sequencing using a 2 x 51 bp protocol. The metatranscriptomic analysis was based on an RNA isolation from 8 mL of the enrichment culture. This sample was pooled from analogous enrichment cultures with similar growth characteristics. The RNA was sequenced using the 2 x 100 bp protocol. Supplementary Table S11 shows the overall statistics of the sequencing experiments.

Data availability

All DNA and RNA sequences that were retrieved within this study are publically available through NCBI BioProject: PRJNA358824.

16S rDNA gene sequence of B_DKE and 18S rDNA/ITS gene sequence of the fungus are available through NCBI GenBank accession numbers KY825129 and KY848528.

References

1. Steering Group for the Workshop on Size Limits of Very Small Microorganisms, National Research Council. in *Size Limits of Very Small Microorganisms: Proceedings of a Workshop 5–7* (National Academies Press, 1999).
2. Torrella, F. & Morita, R. Y. Microcultural study of bacterial size changes and microcolony and ultramicrocolony formation by heterotrophic bacteria in seawater. *Appl. Environ. Microbiol.* **41**, 518–527 (1981).
3. Bae, H. C., Cota-Robles, E. H. & Casida, L. E. Microflora of soil as viewed by transmission electron microscopy. *Appl. Microbiol.* **23**, 637–648 (1972).
4. Folk, R. L. SEM imaging of bacteria and nanobacteria in carbonate sediments and rocks. *J. Sediment. Petrol.* **63**, 990–999 (1993).
5. Kajander, E. O. & Ciftcioglu, N. Nanobacteria: an alternative mechanism for pathogenic intra- and extracellular calcification and stone formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 8274–8279 (1998).
6. Cisar, J. O. *et al.* An alternative interpretation of nanobacteria-induced biomineralization. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97**, 11511–11515 (2000).
7. Kjelleberg, S. No Title. in *Trends in Microbial Ecology* (eds. Guerrero, R. & Pedros-Alio, C.) (Spanish Society for Microbiology, 1993).
8. Miyoshi, T., Iwatsuki, T. & Naganuma, T. Phylogenetic characterization of 16S rRNA gene clones from deep-groundwater microorganisms that pass through 0.2-micrometer-pore-size filters. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 1084–1088 (2005).
9. Luef, B. *et al.* Diverse uncultivated ultra-small bacterial cells in groundwater. *Nat. Commun.* **6**, 6372 (2015).

10. Hahn, M. W. *et al.* Isolation of novel ultramicrobacteria classified as actinobacteria from five freshwater habitats in Europe and Asia. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 1442–1451 (2003).
11. Suzina, N. E. *et al.* Novel ultramicrobacteria, strains NF4 and NF5, of the genus *Chryseobacterium*: Facultative epibionts of *Bacillus subtilis*. *Microbiology* **80**, 535–548 (2011).
12. Duda, V. I. *et al.* A cytological characterization of the parasitic action of ultramicrobacteria NF1 and NF3 of the genus *Kaistia* on chemoorganotrophic and phototrophic bacteria. *FEMS Microbiol. Ecol.* **69**, 180–193 (2009).
13. Rappé, M. S., Connon, S. a, Vergin, K. L. & Giovannoni, S. J. Cultivation of the ubiquitous SAR11 marine bacterioplankton clade. *Nature* **418**, 630–633 (2002).
14. Waters, E. *et al.* The genome of *Nanoarchaeum equitans*: insights into early archaeal evolution and derived parasitism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 12984–8 (2003).
15. Jahn, U. *et al.* *Nanoarchaeum equitans* and *Ignicoccus hospitalis*: New insights into a unique, intimate association of two archaea. *J. Bacteriol.* **190**, 1743–1750 (2008).
16. Giannone, R. J. *et al.* Life on the edge: functional genomic response of *Ignicoccus hospitalis* to the presence of *Nanoarchaeum equitans*. *ISME J.* **9**, 101–14 (2015).
17. Wurch, L. *et al.* Genomics-informed isolation and characterization of a symbiotic Nanoarchaeota system from a terrestrial geothermal environment. *Nat. Commun.* **7**, 1–10 (2016).
18. Baker, B. J. *et al.* Enigmatic, ultrasmall, uncultivated Archaea. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 8806–8811 (2010).
19. Baker, B. J. *et al.* Lineages of acidophilic archaea revealed by community genomic analysis. *Science* **314**, 1933–1935 (2006).

20. Comolli, L. R., Baker, B. J., Downing, K. H., Siegerist, C. E. & Banfield, J. F. Three-dimensional analysis of the structure and ecology of a novel, ultra-small archaeon. *Isme J* **3**, 159–167 (2009).
21. Justice, N. B. *et al.* Heterotrophic archaea contribute to carbon cycling in low-pH, suboxic biofilm communities. *Appl. Environ. Microbiol.* **78**, 8321–8330 (2012).
22. Amaral-Zettler, L. A. *et al.* Microbial community structure across the tree of life in the extreme Río Tinto. *ISME J.* **5**, 42–50 (2011).
23. Méndez-García, C. *et al.* Microbial stratification in low pH oxic and suboxic macroscopic growths along an acid mine drainage. *ISME J.* **8**, 1259–74 (2014).
24. Ziegler, S., Ackermann, S., Majzlan, J. & Gescher, J. Matrix composition and community structure analysis of a novel bacterial pyrite leaching community. *Environ. Microbiol.* **11**, 2329–2338 (2009).
25. Ziegler, S. *et al.* Oxygen-dependent niche formation of a pyrite-dependent acidophilic consortium built by archaea and bacteria. *ISME J.* **7**, 1725–1737 (2013).
26. Droege, J., Gregor, I. & McHardy, A. C. Taxator-tk: Precise taxonomic assignment of metagenomes by fast approximation of evolutionary neighborhoods. *Bioinformatics* **31**, 817–824 (2015).
27. Golyshina, O. V *et al.* The novel extremely acidophilic, cell-wall-deficient archaeon *Cuniculiplasma divulgatum* gen. nov., sp. nov. represents a new family, *Cuniculiplasmataceae* fam. nov., of the order *Thermoplasmatales*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **66**, 332–340 (2016).

28. Yelton, A. P. *et al.* Comparative genomics in acid mine drainage biofilm communities reveals metabolic and structural differentiation of co-occurring archaea. *BMC Genomics* **14**, 485 (2013).
29. Schäfer, G., Engelhard, M. & Müller, V. Bioenergetics of the Archaea. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **63**, 570–620 (1999).
30. Bräsen, C., Esser, D., Rauch, B. & Siebers, B. Carbohydrate metabolism in Archaea: current insights into unusual enzymes and pathways and their regulation. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **78**, 89–175 (2014).
31. Budgen, N. & Danson, M. J. Metabolism of glucose via a modified Entner-Doudoroff pathway in the thermoacidophilic archaeobacterium *Thermoplasma acidophilum*. *FEBS Lett.* **196**, 207–210 (1986).
32. Reher, M., Fuhrer, T., Bott, M. & Schönheit, P. The nonphosphorylative entner-doudoroff pathway in the thermoacidophilic euryarchaeon *Picrophilus torridus* involves a novel 2-Keto-3-deoxygluconate-specific aldolase. *J. Bacteriol.* **192**, 964–974 (2010).
33. Golyshina, O. V. *et al.* Biology of archaea from a novel family *Cuniculiplasmataceae* (Thermoplasmata) ubiquitous in hyperacidic environments. *Sci. Rep.* **6**, 39034 (2016).
34. Ruepp, A. *et al.* The genome sequence of the thermoacidophilic scavenger *Thermoplasma acidophilum*. *Nature* **407**, 508–513 (2000).
35. Fütterer, O. *et al.* Genome sequence of *Picrophilus torridus* and its implications for life around pH 0. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 9091–9096 (2004).
36. Say, R. F. & Fuchs, G. Fructose 1,6-bisphosphate aldolase/phosphatase may be an ancestral gluconeogenic enzyme. *Nature* **464**, 1077–1081 (2010).

37. Baker, B. J., Lutz, M. A., Dawson, S. C., Bond, P. L. & Banfield, J. F. Metabolically active eukaryotic communities in extremely acidic mine drainage. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 6264–6271 (2004).
38. Hujšlová, M., Kubátová, A., Kostov, M., Blanchette, R. A. & Beer, Z. W. De. Three new genera of fungi from extremely acidic soils. *Mycol. Prog.* **13**, 819–831 (2014).
39. Burstein, D. *et al.* New CRISPR-Cas systems from uncultivated microbes. *Nat. Lett.* **542**, 237–241 (2017).
40. Huber, H. & Stetter, K. O. in *The Prokaryotes: An evolving electronic resource for the microbiological community* (eds. Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H. & Stackebrandt, E.) (Springer, 2001).
41. Pernthaler, A., Pernthaler, J. & Amann, R. Sensitive multi-color fluorescence *in situ* hybridization for the identification of environmental microorganisms. *Mol. Microb. Ecol. Man.* **3**, 711–726 (2004).
42. Stahl, D. A. & Amann, R. in *Nucleic acid techniques in bacterial systematics* (eds. Stackebrandt, E. & Goodfellow, M.) 205–242 (Wiley, 1991).
43. Stookey, L. L. Ferrozine - a new spectrophotometric reagent for iron. *Anal. Chem.* **42**, 779–781 (1970).
44. Cenis, J. L. Rapid extraction of fungal DNA for PCR amplification. *Nucleic Acids Res.* **20**, 2380 (1992).
45. White, T. J., Bruns, T., Lee, S. & Taylor, J. in *PCR protocols: a guide to methods and applications*. (eds. Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. & White, T. J.) 315–322 (Academic Press Inc, 1990).
46. Ye, J. *et al.* Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics* **13**, 134 (2012).

47. Lo, I. *et al.* Strain-resolved community proteomics reveals recombining genomes of acidophilic bacteria. *Nature* **446**, 537–541 (2007).

Acknowledgements

We gratefully thank Dr. Sibylle Bartsch and Dr. Katharina Geiger for fruitful discussions and are grateful for funding by the DFG.

Author contribution statement

SK – did culturing experiments, wrote main manuscript file, prepared figure 1, figure 5 and figure 6

AB – did bioinformatic analysis of metagenomic and metatranscriptomic data

PCM – prepared figure 2, figure 3 and figure 4

ACMcH – supervised the bioinformatic part

JG – supervised the work

All authors reviewed the manuscript.

Additional Information

Competing financial interests statement

The authors declare that there is no competing financial interest.

Figure Legends

Figure 1: Phylogenetic tree of 16S rRNA gene sequences of all archaea found in the enrichment culture and related organisms. A data set based on the muscle alignment was used for tree building via the neighbor joining method. The bootstrap values were calculated from 1000 replicates, whereas values >50 are shown. The 16S rRNA gene sequence of ARMAN-1 was excluded, because it is incomplete and much shorter than all other published 16S rRNA gene sequences. An alignment with A_DKE shows a 99% identity.

Figure 2: a) Total number of orthoMCL families found in indicated genomes. b) Functional enrichment analysis of orthologous genes. The heat map depicts the percentage of orthoMCL groups of each genome assigned to each indicated functional category. Stars indicate FDR corrected significance levels for difference in the number of orthoMCL families between the four ARMAN and eight *Thermoplasmatales* genomes (one star for value below '0.05', two for '0.01' and three for '0.001'). c) Heat map and hierarchical clustering dendrogram depicting the percentage of gene families shared between genomes. Node labels in the tree indicate bootstrap support after 100 iterations. Columns are normalized based on the total number of gene families found in genomes.

Figure 3: a) Genome comparison of ARMAN-2/-4/-5 and A_DKE generated with Donut (unpublished). From outer track to inner track: (1) GC content (higher values colored in blue, lower values are colored green). (2) ORF density (annotated and hypothetical) within a sliding window over the genomes visualized in black. ORF density of hypothetical ORFs visualized in red based on a sliding window approach. (3-8) Matches

to KEGG terms in this order: beta-Oxidation (yellow), Oxidative phosphorylation (green), Entner-Doudoroff pathway (pink), pentose phosphate pathway (purple), citric acid cycle (orange), glycolysis/gluconeogenesis (blue). Lines within the inner segment indicate significant similarity between ORFs of the individual genomes and are colored according to KEGG terms if they fully overlap these. Contig sizes are visualized in Mb. b) Bar plot showing the over-abundance of functions based on *de novo* inferred gene families based on orthoMCL analysis of three ARMAN genomes and the A_DKE genome. Length of the bars corresponds to the mean difference in the fraction of gene families annotated with indicated functional group. Lines show the difference to the ARMAN genomes with the minimal and the maximal fraction. Only functional groups are shown that differ in more than 0.2% or less than -0.2%. c) Venn diagram of gene families shared between indicated genomes. Gene families related to pathogenicity factors were not included in this overview.

Figure 4: a) Genome comparison of *C. divulgatum* S5, A_DKE, C_DKE and *T. acidicola* generated with Donut (unpublished). From outer track to inner track: (1) GC content (higher values colored in blue, lower values are colored green). (2) ORF density (annotated and hypothetical) within a sliding window over the genomes visualized in black. ORF density of hypothetical ORFs visualized in red based on a sliding window approach. (3-8) Matches to KEGG terms in this order beta-Oxidation (yellow), Oxidative phosphorylation (green), Entner Doudoroff pathway (pink), Pentose phosphate pathway (purple), Citric acid cycle (orange), Glycolysis/Gluconeogenesis (blue). Lines within the inner segment indicate significant similarity between ORFs between genomes and are colored according to KEGG terms if they fully overlap these. Contig sizes are visualized in Mb. b) Bar plot showing the over-abundance of orthoMCL families assigned

to indicated functional categories in C_DKE compared to B_DKE. Of these, phosphotransferase system is uniquely present in C_DKE compared to B_DKE. Only functional groups are shown that differ in more than 0.2% or less than -0.2%. c) Venn diagram of gene families shared between indicated genomes. Gene families related to pathogenicity factors were not included in this overview.

Figure 5: Postulated metabolism of all three archaea of the enrichment culture. Intermediates and catalyzing enzymes are indicated. The expression levels of the corresponding genes are listed. Blue numbers indicate RPKM-values of A_DKE, while red and green numbers refer to B_DKE and C_DKE expression, respectively. Abbreviations: PGM: phosphomannomutase/phosphoglucomutase, PGI: glucose/mannose-6-phosphate isomerase, FBP: fructose 1,6-bisphosphate aldolase/phosphatase, TPI: triosephosphate isomerase, GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (NAD(P)), PGK: phosphoglycerate kinase, PGAM: 2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase, ENO: enolase, PEPCK: phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP), PPDCK: pyruvate, orthophosphate dikinase; GDH: glucose/galactose 1-dehydrogenase (NADP⁺), GAD: gluconate/galactonate dehydratase, KD(P)GA: 2-dehydro-3-deoxy-D-gluconate/2-dehydro-3-deoxy-phosphogluconate aldolase, GADH: D-glyceraldehyde dehydrogenase, GAPN: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase [NAD(P)⁺], 2PGK: glycerate 2-kinase, PK: pyruvate kinase, PDH: pyruvate dehydrogenase; CS: citrate synthase, ACO: aconitase, IDH: isocitrate dehydrogenase, SCS: succinyl-CoA synthetase, SDH/FUMR: succinate dehydrogenase/fumarate reductase, FUMH: fumarate hydratase, MDH: malate dehydrogenase.

Figure 6: a) Cell concentrations of the enrichment cultures calculated from qPCR data of A_DKE, B_DKE and C_DKE, b) with corresponding pH values and Fe(II) concentrations

over a time period of 11 weeks. Corresponding CARD-FISH pictures of enrichment cultures showing: c) a culture containing B_DKE and C_DKE (red, ARCH915, Alexa 546) and A_DKE (green, ARM980, Alexa 488) in agglomerates and d) an enrichment culture containing only B_DKE (red, ARCH915, Alexa 546), growing as single cells. Of note, the CARD-FISH fluorescence signal is not suitable to establish correct cell sizes and cells will most probably appear larger than they are.

Figure 1

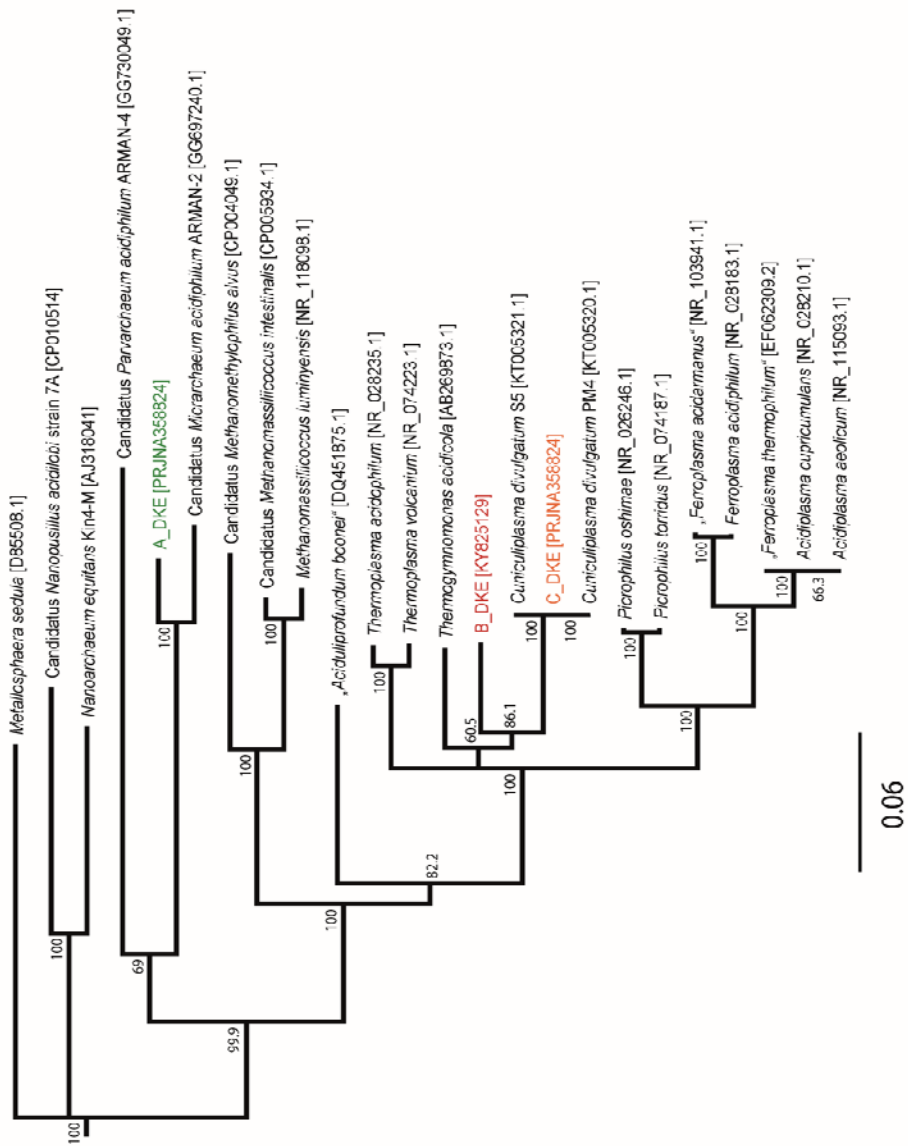


Figure 2

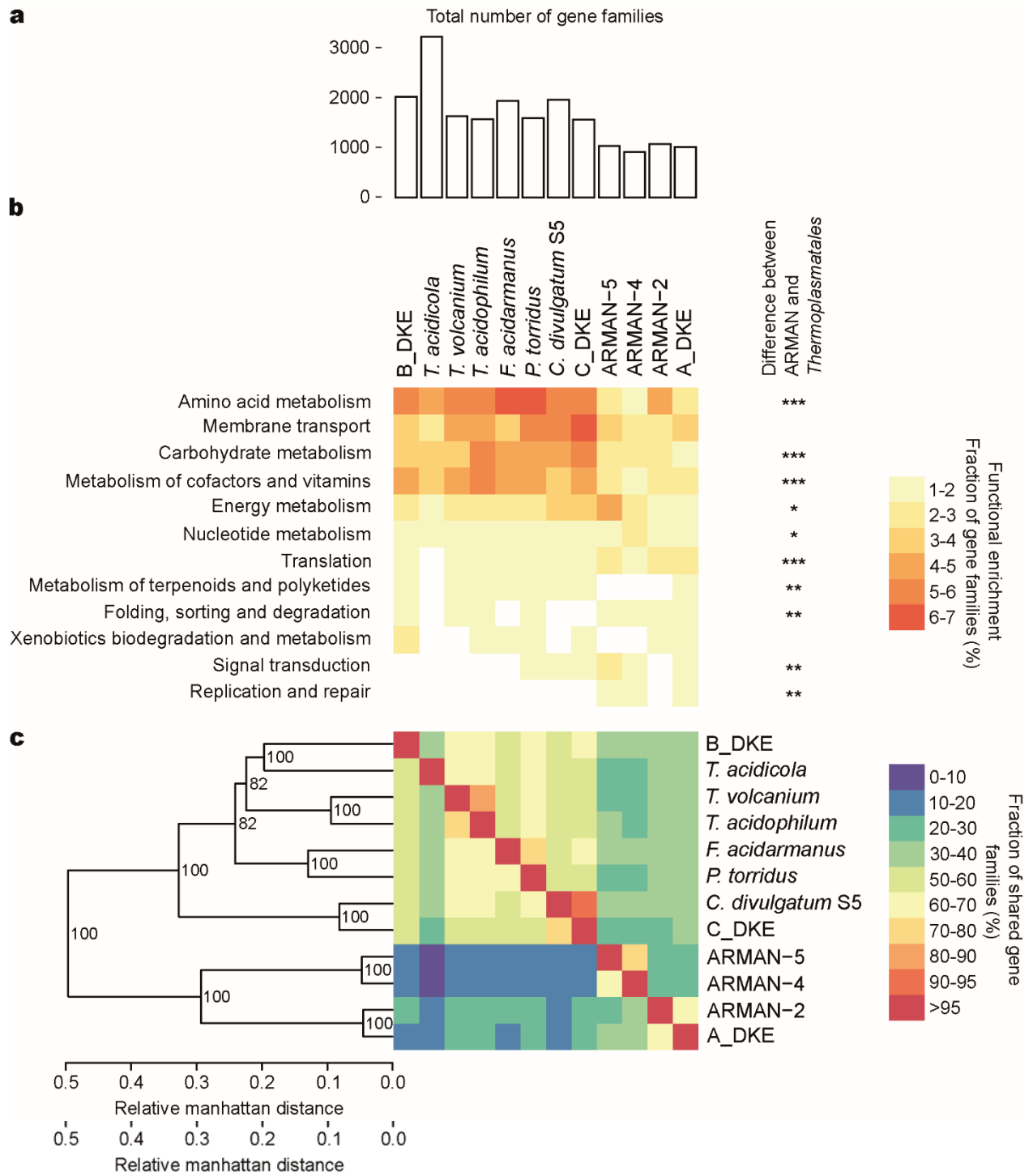


Figure 3

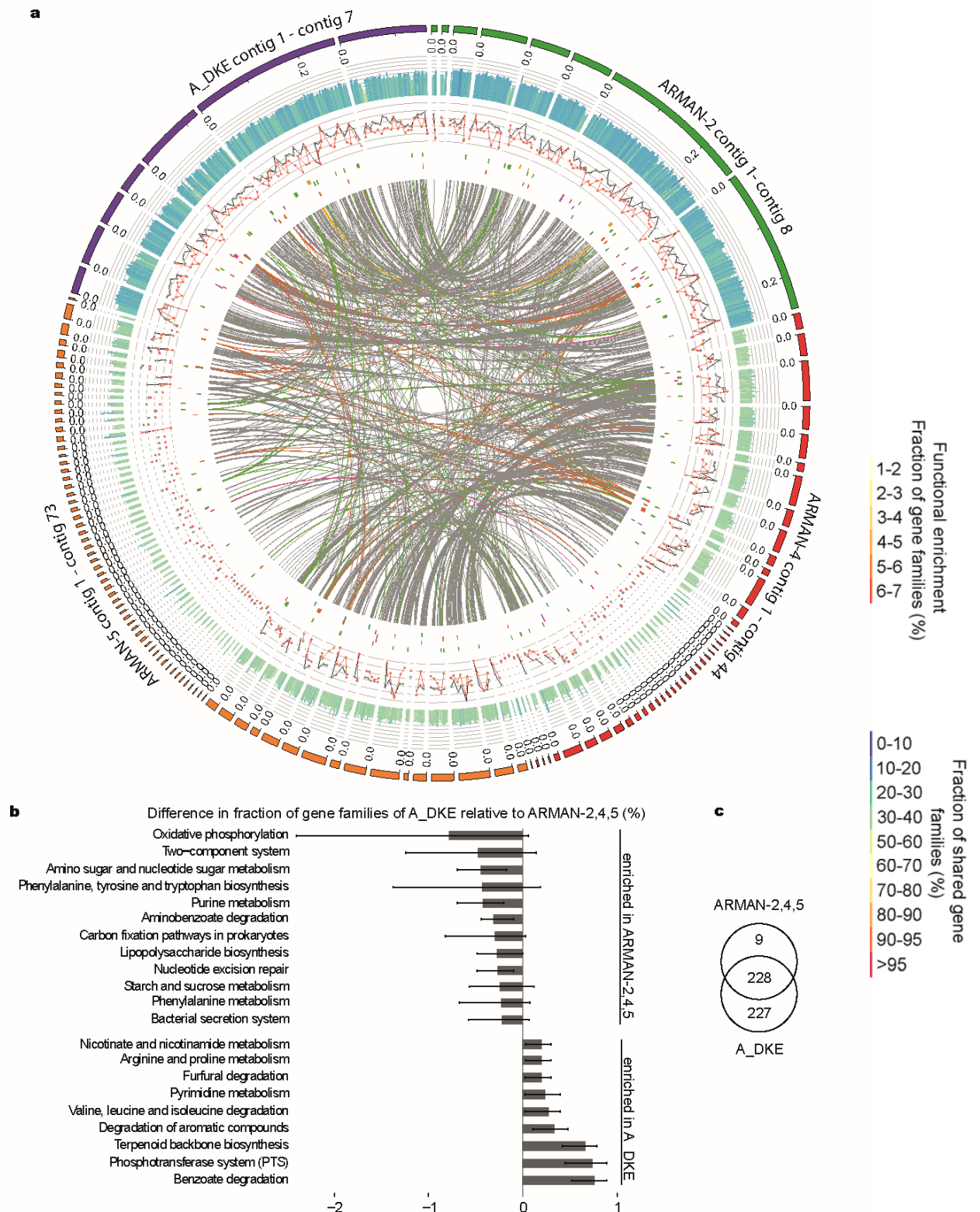


Figure 4

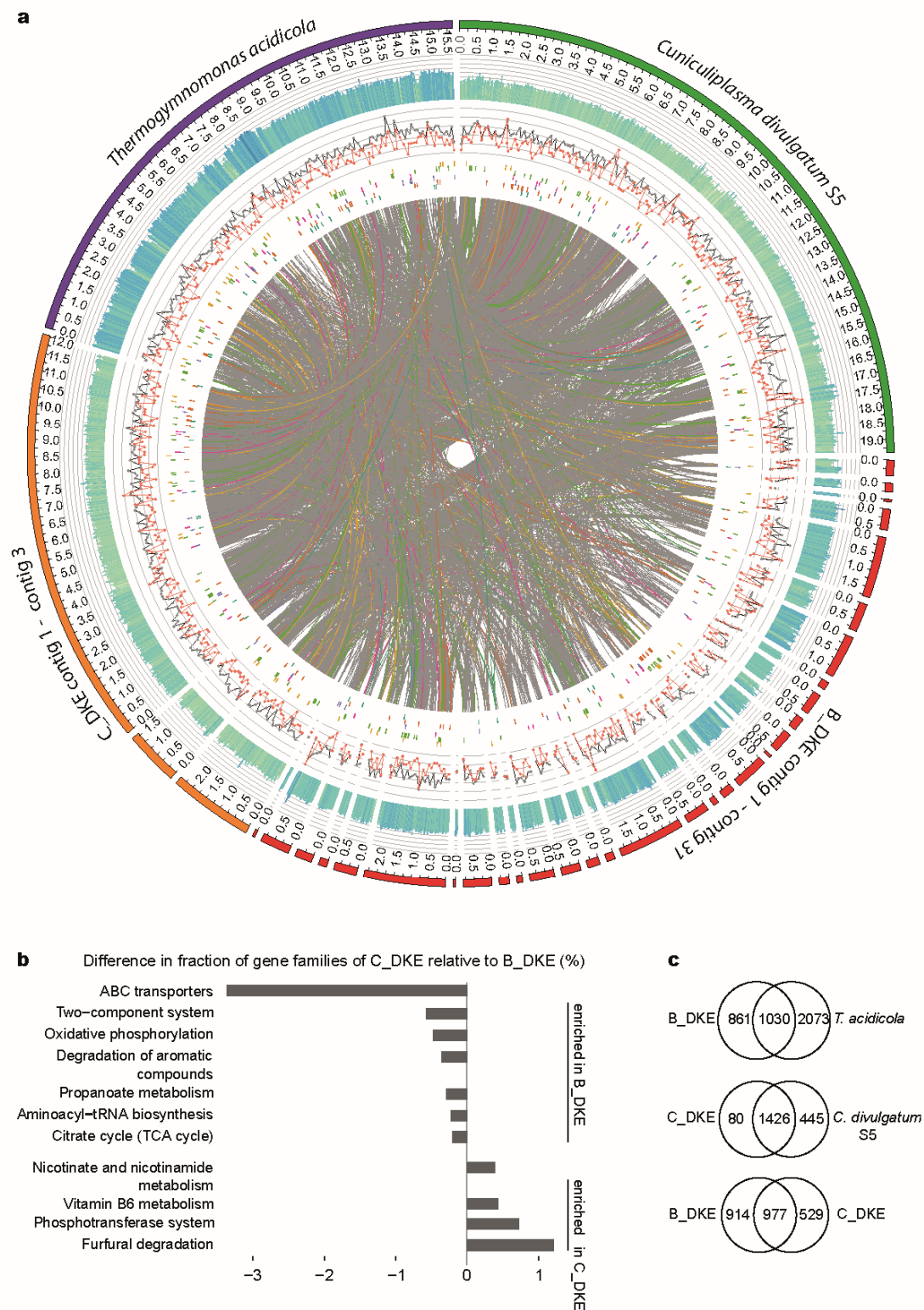


Figure 5

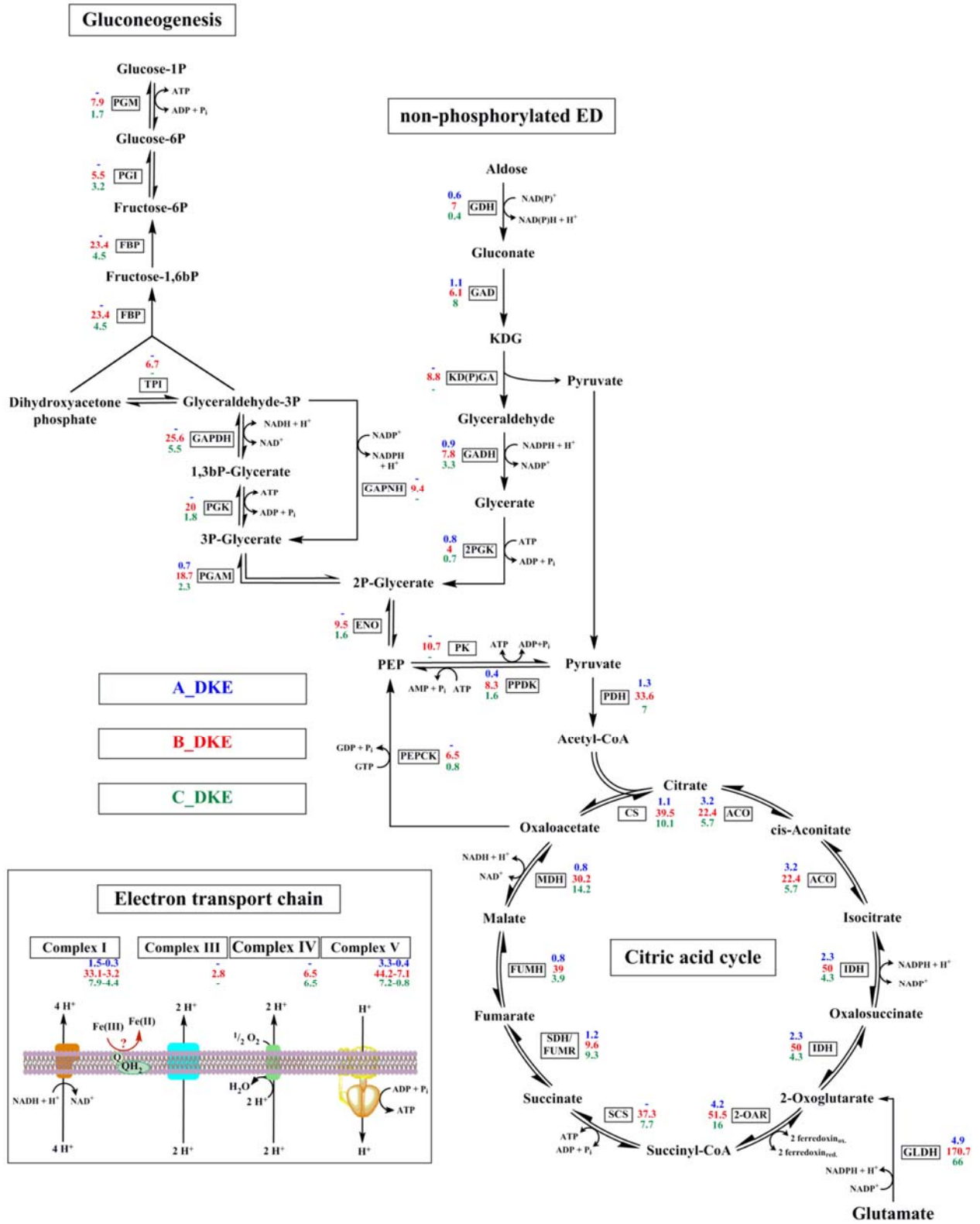
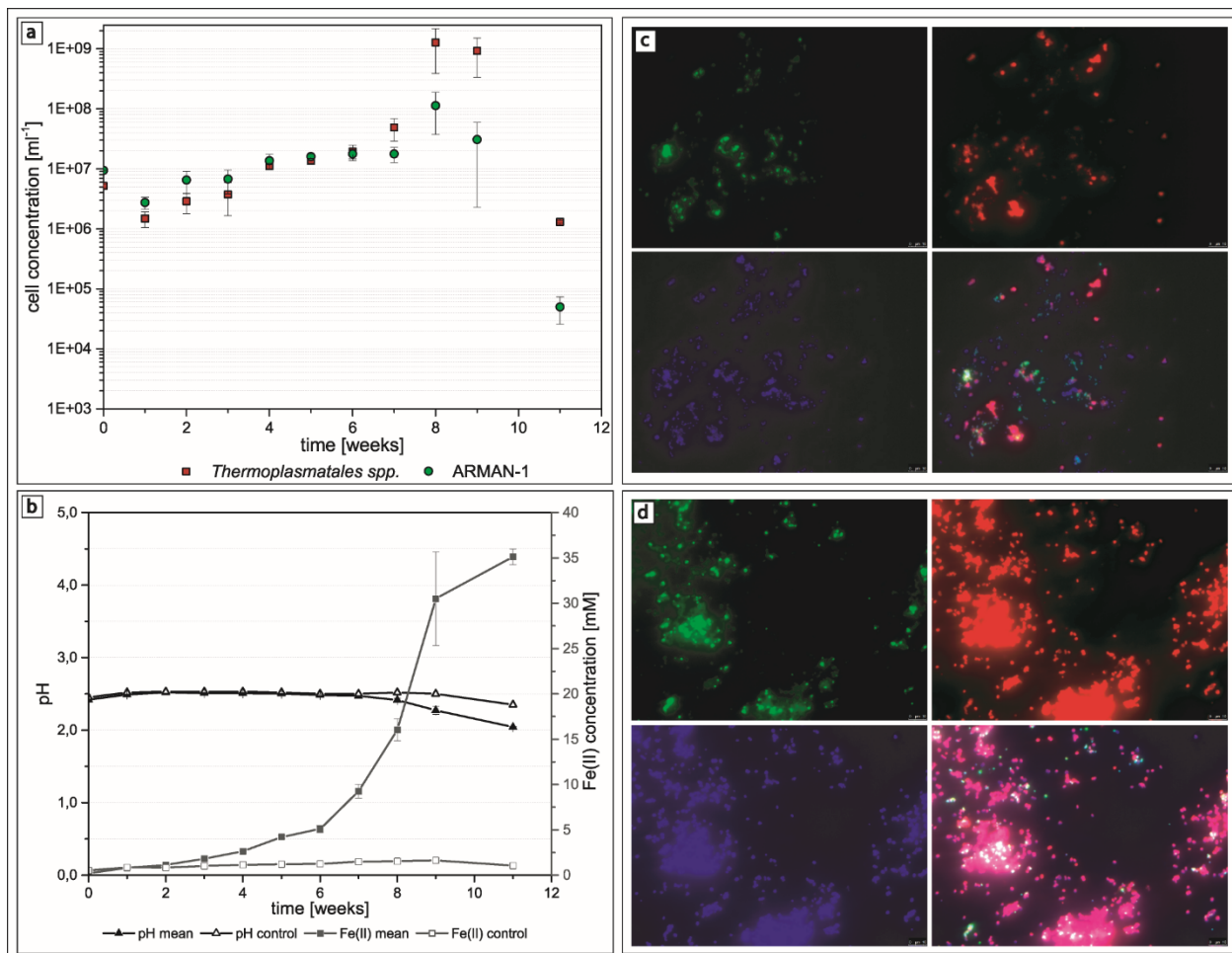


Figure 6



Danke!

Danksagung

Zunächst möchte ich meinem Betreuer Johannes Gescher für das tolle Thema und die Möglichkeit danken, meine Doktorarbeit in seiner Arbeitsgruppe anfertigen zu dürfen. Weiterhin danke ich dir für deine großartige Unterstützung, auch in schwierigen Zeiten und eine stets positive Einstellung. Vielen Dank für die vielen tollen Möglichkeiten, die du mir offengelegt hast.

Ein weiterer großer Dank gilt meinen Kooperationspartnern aus dem Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung. Allen voran Andreas Bremges für die wiederholten Analysen, Fachsimpeleien und geduldigen Erklärungen für einen Bioinformatik-Neuling. Auch Philipp Münch und Alice McHardy möchte ich für die gute Zusammenarbeit danken.

Auch meinen Biofilm-Kooperationspartnern gilt ein großes Dankeschön. Ich danke vor allem Silla Hansen für die gute Zusammenarbeit bei der Entwicklung der Fließzellen. Gerade die Anfangszeit war sehr spannend und bin froh ein Teil des Entwicklungsprozesses gewesen zu sein. Eva und Carsten danke ich für den großen Einsatz und die langen Diskussionen für die letztlich gelungene Umsetzung des automatisierten FISH/CARD-FISH. Carsten, vielen vielen Dank für deine unendliche Geduld und Bereitschaft mit stets zu späten Mikrobiologen zusammenarbeiten zu wollen. Letztlich danke ich natürlich Prof. Niemeyer und Prof. Hubbuch, ohne die diese Projekte nicht sattgefunden hätten.

Ein großer Dank geht an meine Studis Stefan, Konstantin, Isa, Tobi! und Sabrina. Vor allem Sabrina möchte ich für ihre Unterstützung während meiner Zeit am Schreibtisch danken und dass du dich so gut um die Kleinen gekümmert hast, während ich weg war.

In diesem Zuge danke ich auch meinen beiden HiWi-nen Vicky und Eva ganz herzlich. Auf euch war/ist stets Verlass und ich hatte immer ein gutes Gefühl dabei, euch mein Heiligstes zu überlassen.

Ein riesengroßes Dankeschön geht an die komplette AG Gescher! Mit euch im Labor habe ich mich immer sehr wohl gefühlt. Es war stets lustig und vor allem nie langweilig!

Ein erster großer Dank geht an Esther, unsere gute Fee im Büro. Vielen Dank für deinen Einsatz und deine großartige Unterstützung mit so vielem, gerade gegen Ende meiner Arbeit. Vor allem meinen beiden ersten Betreuern Schnubbi und Kadda danke ich ganz herzlich! Ihr habt mir so ziemlich alles beigebracht, was man in einem Labor zum Überleben braucht. Stets geduldig und mit einem Scherz auf den Lippen habt ihr eine manchmal vielleicht etwas neurotische Studentin auf den rechten mikrobiologischen Weg geführt. Vielen Dank Sibylle für deine stets offenen Ohren und deinen unschätzbaren Rat bei so vielen meiner Fragen. Vor allem bei der Relativierung meiner Sorgen warst du mir stets eine unschätzbare Hilfe. Vielen Dank Nicola für deine erfrischende Art und immer lustige Gespräche. Vielen Dank France für deine kompetente und geduldige Hilfe bei meinen Klonierungen. Vielen Dank Sebastian für die Knallfrösche. Gunnar, ich sag nur Grau Grau Grau...

Ein großes Dankeschön geht an Carina für die vielen Mittagspausen, diverse Taxifahrten und viel leckeres Essen! Auch ihrer besseren Hälfte gilt in diesem Zuge ein großer Dank. Ach und Julian: 😊

Natürlich möchte ich meinen Freunden für ihre Unterstützung, das Verständnis und eine abwechslungsreiche Zeit danken. Besonders Toni danke ich von Herzen für die vielen Marktbesuche, verpennten Samstage und mittlerweile die vielen Beratungsgespräche, die besonders in stressigen Zeiten eine Wohltat waren.

Last but not least geht ein riesen Dankeschön an meine Familie. Danke Mama und Papa für eure großartige Unterstützung, für euer Verständnis und euer Vertrauen bei all meinen Entscheidungen. Danke Nadine für die große Hilfe mit dem kleinen Fellknäul und dass auf euch immer Verlass ist. Sei es ein Hundesitter oder eine spontane Gartenchillerei.

Auch wenn er es nicht lesen kann, möchte ich Happy für die vielen therapeutischen Spaziergänge und Spielstunden danken, die gerade gegen Ende der Arbeit einfach unersetzlich waren.

Tobi, vielen Dank für deine bedingungslose Hilfe und unbeschreibliche Unterstützung in allen Lagen. Mit deinem fachmännischen Rat, den vielen Diskussionen und beruhigenden Worten warst du mir stets Motivation und Anker zugleich. Du bist von meinem Masterstudenten zum besten Teil meines Lebens und damit auch dieser Arbeit geworden. Ich bin unendlich dankbar, dass wir diesen Weg gemeinsam gehen durften.