

**Struktur- und Funktionsbeziehungen anaerober, extrem
halophiler mikrobieller Gemeinschaften aus
Untergrundgasspeichern**

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades einer Doktorin
der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

in der Bayreuther Graduiertenschule für Mathematik und Naturwissenschaften
(BayNAT)

der Universität Bayreuth

vorgelegt von

Laura Schwab

aus Kronach

Bayreuth, 2023

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Januar 2019 bis Dezember 2022 im Department für Isotopenbiogeochemie am Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung Leipzig unter der Betreuung von Herrn Dr. Carsten Vogt und Herrn Professor Dr. Matthias Noll angefertigt.

Vollständiger Abdruck der von der Bayreuther Graduiertenschule für Mathematik und Naturwissenschaften (BayNAT) der Universität Bayreuth genehmigten Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades einer Doktorin der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.).

Dissertation eingereicht am: 09.01.2023

Zulassung durch das Leitungsgremium: 26.01.2023

Wissenschaftliches Kolloquium: 28.06.2023

Amtierender Direktor: Prof. Dr. Hans Keppler

Prüfungsausschuss:

Prof. Dr. Matthias Noll Gutachter

Prof. Dr. Tillmann Lüders Gutachter

PD Dr. A. Weig Vorsitz

Prof. Dr. D. Schüler

Die vorliegende Arbeit ist als Monografie verfasst.

Teile der Arbeit sind bereits in den folgenden Publikationen erschienen:

Sulfate reduction and homoacetogenesis at various hypersaline conditions: implications for H₂ underground gas storage

Schwab, L., Nowack, G., Prinsen, L., Popp, D., Noll, M., Vogt, C., Wagner, M.

DOI: <https://doi.org/10.3389/fenrg.2023.1125619>

Structural analysis of microbiomes from salt caverns used for underground gas storage

Schwab, L., Popp, D., Nowack, G., Bombach, P., Vogt, C., Richnow, H.H.

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2022.04.170>

„Ich bin davon überzeugt, meine Freunde, dass das Wasser dereinst als Brennstoff Verwendung findet, dass Wasserstoff und Sauerstoff, die Bestandteile desselben, zur unerschöpflichen und bezüglich ihrer Intensität ganz ungeahnten Quelle der Wärme und des Lichtes werden.“

(Jules Verne, Die geheimnisvolle Insel, 1875)

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	IX
Zusammenfassung	XIII
Abstract	XV
Abkürzungsverzeichnis	XVII
Abbildungsverzeichnis	XIX
Tabellenverzeichnis	XX
1 Einleitung	1
1.1 Grüner Wasserstoff als Schlüsseltechnologie der Energiewende	2
1.2 Salzkavernen als Untergrundgasspeicher	3
1.3 Halophile Mikroorganismen.....	6
1.3.1 Mikrobielle Anpassungsstrategien an erhöhte Salzgehalte	6
1.3.2 Habitate salzliebender Mikroorganismen	8
1.4 Durch Wasserstoff induzierbare mikrobielle Stoffwechselforgänge	9
1.4.1 Wasserstoffoxidation.....	10
1.4.2 Sulfatreduktion	11
1.4.3 Homoacetogenese	11
1.4.4 Methanogenese	12
1.4.5 Kohlenstofffixierung.....	12
1.5 Methoden zur Charakterisierung von mikrobieller Diversität und Aktivität	13
1.5.1 Molekularbiologische Methoden zur Charakterisierung mikrobieller Diversität....	14
1.5.2 Isotopenchemische Methoden zur Charakterisierung mikrobieller Aktivität	14
1.6 Motivation und Hypothesen	18
2 Material and Methoden	21
2.1 Soleprobenahme am Kavernenfeld Mitteldeutschland.....	23
2.2 Hydrochemische Analyse der Soleproben	24

2.3	Bestimmung der mikrobiellen Zellzahl der Soleproben.....	26
2.4	Analyse der mikrobiellen Gemeinschaft	27
2.4.1	Extraktion mikrobieller DNA	27
2.4.2	DNA-Amplifikation und Amplikonsequenzierung.....	29
2.4.3	Bioinformatische Analyse der mikrobiellen Diversität	32
2.4.4	Bestimmung des funktionellen Potentials mittels Metagenomsequenzierung	33
2.5	Anaerobe Kultivierung und Monitoring des mikrobiellen Wachstums	34
2.5.1	<i>Desulfovermiculus halophilus</i> DSM 18834.....	34
2.5.2	Anreicherungskultur MP-32.....	35
2.5.3	Anreicherungskultur SF-X	37
2.5.4	Bestimmung des mikrobiellen Wachstums	38
2.6	Einfluss von H ₂ Gas auf mikrobielles Wachstum und Sulfidogenese	39
2.7	Einfluss von H ₂ auf mikrobiell induzierte Korrosion	40
2.7.1	Messung der mikrobiellen Wasserstoffoxidation.....	42
2.7.2	Optische Analyse der Oberflächenveränderung von Eisenprüfkörpern	42
2.8	Einfluss von Wasserstoff-Gas auf mikrobielle Aktivität auf Einzelzellebene	45
2.8.1	Etablierung eines simultanen Nachweises von H und C Isotopen in halophilen Mikroorganismen.....	46
2.8.2	Quantifizierung aktiver Mikroorganismen mittels nanoSIMS	49
2.9	Auswirkungen von Salzgehalt und Kohlenstoffquellen	50
3	Ergebnisse	53
3.1	Erdgaskavernen als mikrobielles Habitat.....	53
3.1.1	Technische und biophysikalische Parameter der beprobten Erdgaskavernen	53
3.1.2	Hydrochemie der Kavernensole	54
3.1.3	Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaft der beprobten Kavernen	56
3.2	Einfluss von Wasserstoff-Gas auf Sulfidogenese und MIC.....	58

3.2.1	Einfluss auf Proliferation und Metabolismus	58
3.2.2	Einfluss von H ₂ auf mikrobiell induzierte Korrosion an Eisenprüfkörpern	61
3.3	Einfluss von Wasserstoff-Gas auf mikrobielle Aktivität auf Einzelzellebene	65
3.3.1	Mikrobielle Assimilation von ² H und ¹³ C in Soleproben	65
3.3.2	Charakterisierung der Anreicherungskultur MP-32	67
3.4	Auswirkungen von Salzgehalt und Kohlenstoffquellen auf Wachstum und Stoffwechsel unter sulfatreduzierenden Bedingungen	69
3.4.1	Zellproliferation, Sulfatreduktion und C1-Stoffwechsel	69
3.4.2	Abschätzung der mikrobiellen Stoffwechselleistungen.....	75
4	Diskussion.....	78
4.1	Erdgaskavernen als mikrobielles Habitat	80
4.2	Einfluss von H ₂ auf Sulfidogenese und MIC	87
4.3	Mikrobielle Aktivität in der Kavernensole.....	90
4.4	Auswirkungen von Salzgehalt und Kohlenstoffquellen auf Wachstum und Stoffwechsel unter sulfatreduzierenden Bedingungen	93
4.5	Fazit	97
5	Ausblick	98
6	Literaturverzeichnis	100
7	Danksagung	124
8	Anhang	126
8.1	Diagramme und Daten zum Energieverbrauch.....	126
8.2	Methodenentwicklung für die Messungen am nanoSIMS.....	127
8.3	Metagenomdaten	131
9	Publikationen, Präsentationen und Poster.....	133
10	(Eidesstattliche) Versicherungen und Erklärungen	134

Zusammenfassung

Um die Ziele der Klimarahmenkonvention einzuhalten und um sich unabhängig von den Energie-Rohstoffen anderer Länder zu machen, fördern Deutschland und die EU-Staaten den Einsatz und Ausbau von erneuerbaren Energien. Zu diesen zählen Wasser- und Windkraft, sowie Photovoltaik. Da deren Produktion aber saisonalen Schwankungen unterliegt, ist es essenziell Speichermöglichkeiten zu finden. Elektrischer Strom kann über Wasserelektrolyse in Wasserstoffgas umgewandelt werden, dieses wiederum kann in großvolumigen Untergrundgasspeichern gelagert werden. Aufgrund ihrer chemischen Eigenschaften bieten sich hierfür Salzkavernen an, die bereits seit Jahrzehnten für die Speicherung von Erdgas genutzt werden. Mit dem Wechsel von Erdgas auf Wasserstoff wird jedoch ein exzellenter Elektronendonator für den Energiestoffwechsel der mikrobiellen Gemeinschaft in die Kaverne eingetragen. Dies kann metabolische Reaktionen induzieren, die einer Risikoanalyse bedürfen. Zum einen kann die Aktivität von Wasserstoff verbrauchenden Mikroorganismen erhöht und so die absolute gespeicherte Gasmenge reduziert werden. Außerdem kann mit den im Salzgestein vorhandenen Sulfatsalzen Schwefelwasserstoff gebildet werden, was mit Korrosion an den Anlagenteilen und einer Verunreinigung des Speichergases einhergeht. Mikrobiologische Untersuchungen an Kavernenspeichern sind durch die betrieblichen Bedingungen erschwert und kostenintensiv, da die Sole, welche sich am Grund von Gaskavernen sammelt, die einzige Möglichkeit der Probenahme darstellt. Bis dato lagen keine Studien bezüglich der mikrobiellen Diversität oder Keimzahl in lokalen Kavernenspeichern vor und lediglich eine Studie, welche die mikrobielle Diversität in verdünnter Sole von kanadischen Kavernenspeichern untersuchte, die als Lagerstätte für kohlenwasserstoffkontaminierten Sand dienten. Unbekannt waren neben der mikrobiellen Zusammensetzung, die hydro- und physikochemischen Parameter der Sole, sowie die Auswirkungen, welche die hohen Salzkonzentrationen und das mutmaßlich geringe Nährstoffangebot auf die mikrobielle Gemeinschaft haben. Im Rahmen dieser Arbeit gelang erstmalig die Charakterisierung der mikrobiologischen Diversität nationaler Kavernenspeicher. Daraus ging hervor, dass sich Kavernenspeicher in der Zusammensetzung ihres Mikrobioms stark unterscheiden, aber zwei taxonomische Gruppen, *Halanaerobiales* und *Desulfovibrionales*, in jeder Kaverne nachgewiesen wurden. Die Makronährstoffe Ammonium (506 μM) und Phosphat (20 μM), sowie Acetat (481 μM) und weitere kurzkettige

Fettsäuren konnten ebenfalls nachgewiesen werden und ein Teil der Soleproben wurde als Medium für Versuche mit halophilen Anreicherungskulturen eingesetzt. Es zeigte sich, dass die mikrobielle Gemeinschaft primär von den hohen Salzkonzentrationen und weniger von den verfügbaren Kohlenstoffquellen bestimmt wurde. Bei Versuchen mit den höchsten Salzgehalten waren die Wachstumsrate und damit metabolische Prozesse, wie Sulfatreduktion, verlangsamt. Um die kultivierungsbasierten Versuche zu ergänzen, wurde eine Methode zur Messung der mikrobiellen Inkorporation von Wasserstoff und Kohlenstoff auf Basis ihrer schweren Isotope etabliert. Dies beinhaltete die Entwicklung eines Protokolls zur Vorbereitung halophiler Mikroorganismen für Messungen im Hochvakuum des nanoSIMS Gerätes, sowie eine Optimierung und Neu-Einstellung der Messparameter, um auch Wasserstoffisotope messen zu können. Dies erlaubte final die Identifikation von 3,6 % bzw. 1,6 % aktiven Mikroorganismen in den Soleproben der Kavernen Cav-B und Cav-C, welche mit H₂ als Elektronendonator inkubiert wurden. Währenddessen wurden in den H₂-freien Ansätzen nur 0,5 % bzw. 3,1 % aktive Zellen nachgewiesen. Versuche mit einer extrem halophilen Anreicherungskultur, welche sich überwiegend aus *Desulfovibrionales* spp. und *Halanaerobiales* spp. zusammensetzt, bestätigen dies. Lange, kultivierungsbasierte Versuche zur Bestimmung der wasserstoffabhängigen Sulfatreduktion in der Kavernensole bestätigen dies. Die Anreicherungskultur erreichte in salzgesättigter Kavernensole innerhalb von 180 Tagen und unter Verbrauch von 40 mM H₂ eine Zellzahl von bis zu 1,5x10⁸ Zellen mL⁻¹. Aus der Analyse des Genoms geht hervor, dass *Desulfohalobiaceae* spp. chemolithoautotroph und über den Wood-Ljungdahl Weg Kohlenstoff fixiert. Die Versuchsansätze mit natürlicher Kavernensole ohne Inokulum hingegen zeigten keine Sulfatreduktion innerhalb des Versuchszeitraums. Zudem wurde keine mikrobiell induzierte Korrosion in Versuchsansätzen mit Eisenprüfkörpern nachgewiesen. In ihrer Gesamtheit weisen die Ergebnisse darauf hin, dass unter autotrophen und sulfatreduzierenden Kavernenbedingungen *Desulfovibrionales* spp. und *Halanaerobiales* spp. zu erwarten sind und einen erhöhten Anteil an Schwefelwasserstoff bilden und Korrosion verursachen. Beide Vorgänge sollten für eine Risikobewertung der Wasserstoffspeicherung im Untergrund berücksichtigt werden. Die etablierte Methode zur Identifikation von aktiven Mikroorganismen in Soleproben bietet eine Möglichkeit, zunehmende mikrobielle Stoffwechselprozesse während der Speicherung von Wasserstoffgas zu überwachen und kann perspektivisch weiterentwickelt werden, um die aktiven Mikroorganismen ihrer taxonomischen Gruppe zuzuordnen.

Abstract

To comply with the goals of the Framework Convention on Climate Change and to become independent of the energy feedstock of other countries, Germany and the EU states promote the use and expansion of renewable energies. These include hydro- and wind power, as well as photovoltaics. However, since their production is subject to seasonal fluctuations, it is essential to find storage options. Electricity can be converted into hydrogen gas via water electrolysis, which in turn can be stored in large-scale underground gas storage facilities. Due to their chemical properties, salt caverns, which have already been used for decades to store natural gas, are ideal for this purpose. However, with the change from natural gas to hydrogen, an excellent electron donor for the energy metabolism of the microbial community is introduced into the cavern. This may induce metabolic reactions that require risk analysis. First, microbial activity may consume hydrogen, reducing the amount of gas stored. In addition, hydrogen sulfide can be formed with the sulfate salts present in the salt rock. This is associated with corrosion of the plant components and contamination of the stored gas. Microbiological investigations of cavern storage facilities are complicated and costly due to the operational conditions, as the brine that collects at the bottom of gas caverns is the only possibility for sampling. To date, there have been no studies on microbial diversity or microbial counts in local cavern storage facilities and only one study examining microbial diversity in diluted brine from a Canadian salt cavern used to store hydrocarbon contaminated sand. In addition to the microbial composition, the hydro- and physicochemical parameters of the brine, as well as the combined effects of the high salt concentrations and the presumably low nutrient supply on the microbial community were unknown. This work was the first to characterize the microbiological diversity of national cavern storage facilities and revealed that these cavern reservoirs differ greatly in the composition of their microbiome, but two taxonomic groups, *Halanaerobiales* and *Desulfovibrionales*, were detected in each cavern reservoir. The macronutrients ammonium (506 μM) and phosphate (20 μM), as well as acetate (481 μM) and other short-chain fatty acids were detected and therefore the brine samples were used as a growth medium for experiments with halophilic enrichment cultures. It was shown that the microbial community was primarily determined by the high salt concentrations and less by the available carbon sources. In experiments with the highest salt contents, the growth rate and thus metabolic processes, such as sulfate reduction, were

slowed down. To complement the cultivation-based experiments, a method was established to measure microbial incorporation of hydrogen and carbon based on their heavy isotopes. This involved the development of a protocol to prepare halophilic microorganisms for measurements in the high vacuum of the nanoSIMS instrument, as well as optimization and re-setting of the measurement parameters to also measure hydrogen isotopes. It finally allowed the identification of 3.6 % and 1.6 % active microorganisms in the brine samples of the caverns Cav-B and Cav-C, which were incubated with H₂ as electron donor. Meanwhile, only 0.5 % and 3.1 % active cells were detected in the H₂-free preparations. This was confirmed in experiments with an extremely halophilic enrichment culture consisting mainly of *Desulfovibrionales* spp. and *Halanaerobiales* spp. Long-term, cultivation-based experiments to determine the hydrogen-dependent sulphate reduction in the cavern brine confirm this. The enrichment culture reached a cell number of up to 1.5x10⁸ cells mL⁻¹ in salt-saturated cavern brine within 180 days and under consumption of 40 mM H₂. The analysis of the genome shows that *Desulfohalobiaceae* spp. are chemolithoautotrophic and fix carbon via the Wood-Ljungdahl pathway. In contrast, the experimental approaches with natural cavern brine without inoculum did not show sulfate reduction during the experimental period. In addition, no microbially induced corrosion was detected in experiments with iron test specimens. Taken as a whole, the results indicate that taxa of *Desulfovibrionales* and *Halanaerobiales* are to be expected and pose a risk under autotrophic and sulfate-reducing cavern conditions. The established method for identifying active microorganisms in brine samples provides a way to monitor increasing microbial during hydrogen gas storage and can be further developed in perspective to assign the active microorganisms to their taxonomic group.

Abkürzungsverzeichnis

Acetyl-CoA	Acetyl-Coenzym A
AprAB	APS Reduktase Komplex
APS	Adenosinphosphosulfat
ASV	Amplikon-Sequenzvariante
ATP	Adenosintriphosphat
C Quelle	Kohlenstoffquelle
CZ	Calvin-Zyklus
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DH	Dicarboxylat-hydroxybutyrat Zyklus
DOC	gelöster organischer Kohlenstoff (engl. <i>dissolved organic carbon</i>)
DsrABC	Sulfitreduktase-Komplex
ECH	Energieumwandelnde Hydrogenase
EPK	Eisenprüfkörper
GC	Gaschromatograph
HH	Hydroxypropionat-Hydroxybutyrat-Zyklus
HIM	Heliumionenmikroskop
HP	3-Hydroxypropionat-Bizyklus
IC	Ionenchromatographie
IRMS	Isotopenverhältnis-Massenspektrometrie (engl. <i>isotope ratio</i>)
KW-Index	Kohlenwasserstoffindex
MAG	Metagenom-assembliertes Genom
MIC	mikrobiell induzierte Korrosion (engl. <i>microbially induced corrosion</i>)

MSA	Multiple Sequenzalignment
MvhD	Methylviologen-reduzierende Hydrogenase
MP-32	Anreicherungskultur MP-32
MRP	Massenauflösungsvermögen (engl. <i>mass resolving power</i>)
nanoSIMS	nano-scale Sekundärionen-Massenspektrometrie
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
pH	Negativ dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
pI	Isoelektrischer Punkt
RNF	Ferredoxin:NAD ⁺ -Oxidoreduktase
ROI	Region von Interesse (engl. <i>region of interest</i>)
rTCA	reduktive Zitronensäure Zyklus (engl. <i>reverse tricarboxylic acid cycle</i>)
SCFA	kurzkettige Fettsäuren (engl. <i>short-chain fatty acids</i>)
SEM	Rasterelektronenmikroskop (engl. <i>scanning electron microscope</i>)
SF-X	Anreicherungskultur SF-X
SIP	Markierung mit stabilen Isotopen (engl. <i>stable isotope probing</i>)
SOB	Schwefeloxidierende Bakterien
SRB	Sulfatreduzierende Bakterien
SRR	Sulfatreduktionsrate
TIC	gesamter, inorganischer Kohlenstoff (engl. <i>total inorganic carbon</i>)
UGS	Untergrundgasspeicher
WLP	Wood-Ljungdahl Weg (engl. <i>Wood Ljungdahl pathway</i>)

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Der Solungsprozess: Entstehung einer Salzkaverne.....	5
Abbildung 2 Potentielle mikrobielle Stoffwechselprozesse in Salzkavernen	10
Abbildung 3 Durch H ₂ induzierbare mikrobielle Stoffwechselprozesse	13
Abbildung 4 Methoden und experimenteller Aufbau	22
Abbildung 5 Probenahme am Kavernenfeld	24
Abbildung 6 Herstellung anaerober Medien nach Widdel (1980)	34
Abbildung 7 Eisenprüfkörper zur mikroskopischen Untersuchung mikrobiell induzierter Korrosion	41
Abbildung 8 Relative Abundanz halophiler Mikroorganismen in den beprobten Erdgaskavernen	56
Abbildung 9 Mikrobielle Proliferation in salzgesättigten Soleproben	59
Abbildung 10 Mikrobielle Diversität in salzgesättigten Soleproben.....	60
Abbildung 11 Oberflächenbeschaffenheit von Eisenprüfkörpern nach Inkubation in Soleproben unter H ₂ Atmosphäre	62
Abbildung 12 Oberflächenbeschaffenheit von Eisenprüfkörpern nach Inkubation in Soleproben ohne H ₂ Atmosphäre.....	63
Abbildung 13 Die ² H Isotopensignatur als Indikator für mikrobielle H ₂ Oxidation	64
Abbildung 14 Mikrobielle Aktivität auf Einzelzellebene in Abhängigkeit von H ₂ Zugabe	66
Abbildung 15 Schlüsselstoffwechselwege und Proteom-Isoelektrischer Punkt ausgewählter MAGs der Anreicherungskultur MP-32	68
Abbildung 16 Proliferation der Anreicherungskultur SF-X in Abhängigkeit zur Salzkonzentration	71
Abbildung 17 Mikrobielle Diversität der Anreicherungskultur SF-X in Abhängigkeit zur Salzkonzentration	72
Abbildung 18 H ₂ Oxidation der Anreicherungskultur SF-X in Abhängigkeit zur Salzkonzentration	73
Abbildung 19 Phylogenetische Zuordnung ausgewählter MAGs der Anreicherungskultur SF-X	76
Abbildung 20 Schlüsselstoffwechselwege und Proteom-Isoelektrischer Punkt ausgewählter MAGs der Anreicherungskultur SF-X.....	77

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Massen und relative Abundanz von Wasserstoff- und Kohlenstoffisotopen.....	15
Tabelle 2 Parameter und Nachweismethoden zur hydrochemischen Charakterisierung der Soleproben	25
Tabelle 3 Materialien für die fluoreszenzbasierte Zellzahlbestimmung.....	26
Tabelle 4 Materialien, Puffer und Lösungen für die Extraktion genomischer DNA.....	28
Tabelle 5 Verwendete Primerpaare für die Amplifikation spezifischer Sequenzabschnitte des 16S rRNA Gens	30
Tabelle 6 Geräte und Kits zur Amplifikation und Sequenzierung von Nukleinsäuren	31
Tabelle 7 Zusammensetzung der verwendeten anaeroben Medien.....	36
Tabelle 8 Verwendete Medienzusätze und deren Zusammensetzung	37
Tabelle 9 Geräte zur Quantifizierung mikrobieller Wachstumsparameter und Stoffwechselprodukte	38
Tabelle 10 Zusammensetzung der Versuchsreihen für die Bestimmung von H ₂ -induzierten mikrobiellen Wachstums und Sulfidogenese	39
Tabelle 11 Zusammensetzung der Versuchsreihen für die Bestimmung mikrobiell induzierter Korrosion	41
Tabelle 12 Puffer und Lösungen für die elektronenmikroskopische Probenvorbereitung	43
Tabelle 13 Geräte zur Bestimmung mikrobiell induzierter Korrosion	44
Tabelle 14 Zusammensetzung der Versuchsreihen für SIP-basierte Einzelzellanalyse	45
Tabelle 16 Materialien und Geräte für die Untersuchung mikrobieller Aktivität auf Einzelzellebene.....	47
Tabelle 17 Chemikalien und Lösungen die Untersuchung mikrobieller Aktivität auf Einzelzellebene.....	48
Tabelle 18 Zusammensetzung der Versuchsreihen zur Bestimmung der Auswirkung von Salzgehalt und C Quellen auf mikrobielles Wachstum	51
Tabelle 19 Kavernenparameter und -daten	54
Tabelle 20 Hydrochemische Zusammensetzung der Soleproben	55
Tabelle 21 Anteil aktiver Zellen der Soleproben in Abhängigkeit von H ₂ als Elektronendonator	65
Tabelle 22 Taxonomische Zuordnung der metagenom-assemblierten Genome	67

Tabelle 22 Übersicht über metabolische Prozesse der Anreicherungskultur SF-X in Abhängigkeit von Salzgehalt und Kohlenstoffquelle	70
Tabelle 23 Taxonomische Zuordnung der SF-X-Mags	75
Tabelle 24 Osmoadaptionsstrategien des zentralen Kavernenmikrobioms.....	81

1 Einleitung

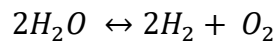
Als Teil der Energiewende veröffentlichte die Bundesregierung im Juni 2020 die Nationale Wasserstoffstrategie (BMWi 2020). Wasserstoff wird darin als Schlüsselement gesehen, um die Bestrebungen zu Klimaneutralität und Dekarbonisierung einzuhalten (Kapitel 1.1). Bisher wird in Deutschland schwankender und saisonaler Bedarf von Wärme und Energie durch Kohlekraftwerke ausgeglichen. Die Abwendung von fossilen und Zuwendung zu nachhaltigen Energieträgern erfordert jedoch die Entwicklung und Exploration von tauglichen Energiespeichern (Matos et al. 2019). Für die großvolumige Speicherung von Wasserstoff sind unter anderem sauerstofffreie Salzkavernen vorgesehen (Tarkowski 2019). Erfahrung im Betrieb mit dieser Form von Untergrundgasspeichern ist bereits vorhanden, da Salzkavernen seit mehr als 40 Jahren als Pufferspeicher für importiertes Erdgas genutzt werden (Kapitel 1.2). Der geplante Wechsel des Speichergases von Methan zu Wasserstoff birgt jedoch technische Gefahren. Diese sind der Verlust und die Verunreinigung des gespeicherten Wasserstoffes und bedürfen einer Risikoanalyse in dem Betrieb, der Anlagenwartung und dem Arbeitsschutz. Die deutlich geringere Molekülgröße von Wasserstoff gegenüber Methan macht es notwendig, die Dichtheit des Speichermediums Salzkaverne und dessen Anschlussnetzes neu zu evaluieren. Des Weiteren wird mit dem Wechsel von Methan zu Wasserstoff ein exzellenter Elektronendonator für mikrobiellen Stoffwechsel in das Habitat Salzkaverne eingetragen. Wasserstoff kann von vielen ökophysiologisch diversen Mikroorganismen oxidiert werden (Schwartz und Friedrich 2006). Diese Reaktion wird von Hydrogenasen katalysiert, die zwar in verschiedene Gruppen eingeteilt werden können, aber universell in prokaryotischen Genomen kodiert sind (Vignais und Billoud 2007; Greening et al. 2016). Bei der Oxidation von Wasserstoff werden Elektronen frei, die auf einen finalen Elektronenakzeptor übertragen werden müssen. Dieser Übertrag wird von den Mikroorganismen zur Gewinnung von zellulärer Energie genutzt, um Prozesse im Stoffwechsel und zur Zellteilung zu realisieren. Damit wird das Potential erhöht, das Wachstum autotropher Mikroorganismen zu beschleunigen bzw. zu initialisieren. Diese erhöhten metabolischen Prozesse werden trophische Netzwerke aufbauen und direkte und indirekte Konsequenzen auf die biogeochemischen Prozesse der Kavernen verursachen. Die chemische Zusammensetzung von Salzgestein erlaubt die Annahme, dass in Salzkavernen CO_2 in der Gasphase bzw. in der wässrigen Phase gelöstes HCO_3^- aus Karbonaten und Sulfat aus

Anhydrit und Gips als finale Elektronenakzeptoren für mikrobielle Gemeinschaften in ausreichender Konzentration zur Verfügung stehen. CO₂ ist das essenzielle Substrat für Acetogene und Methanogene und geht mit der Bildung der Abbauprodukte Acetat und Methan einher. Bei der Verwendung von Sulfat als finalen Elektronenakzeptor bilden Sulfat-reduzierende Mikroorganismen Schwefelwasserstoff, ein korrosives Gas, das schon in geringen Mengen humantoxisch ist. Neben der Wasserstoffzehrung käme in diesem Fall eine Beschädigung der Anlagenteile und eine Gesundheitsgefährdung hinzu. Über die Struktur und metabolischen Potentiale von mikrobiellen Gemeinschaften in Salzkavernen, ist jedoch nur wenig bekannt. Informationen können bisher aus ähnlichen Habitaten wie Sodaseen, salinen Aquiferen oder Salzgewinnungsstätten abgeleitet werden (Sorokin et al. 2014b; Lopez-Lopez et al. 2010; Struchtemeyer et al. 2005) und sind in Kapitel 1.3 zusammengefasst.

1.1 Grüner Wasserstoff als Schlüsseltechnologie der Energiewende

Zu Beginn der 1990er lag der Energieverbrauch in Deutschland bei 4100 TWh. Davon wurden 86 % durch fossile Energieträger und 11 % durch Kernenergie gedeckt, deren Rohstoffe nahezu vollständig importiert werden (Umweltbundesamt 2022). Für den erleichterten Transport wurde bereits ab den 1950ern die Verlegung nach Deutschland diskutiert und schließlich umgesetzt. Im Jahre 2005 erfolgte die Planung und 2011 die Fertigstellung einer weiteren Pipeline durch die Nordsee. Im Schnitt wurden so in den vergangenen Jahren wöchentlich 1200 Millionen m³ Gas importiert (Umweltbundesamt 2022). Seit 2000 ist die Einbringung von regenerativen Energiequellen durch das *Erneuerbare-Energien-Gesetz* geregelt. Es ist vorgesehen, dass der Anteil erneuerbarer Energien bis zum Jahr 2030 beim Bruttoendenergieverbrauch auf 30 % und bis 2050 auf 80 % steigen soll. Der derzeitige Anteil erneuerbarer Energien an der Bruttostromerzeugung liegt bei 40 % (Umweltbundesamt 2022). Ein bestehendes Problem, welches die Ausbeute erneuerbarer Energien mindert, ist die limitierte Netzkapazität. Zuviel produzierter Strom kann nicht ins Netz eingespeist werden und geht verloren, weil er nicht gespeichert werden kann. Solar- und Windanlagen werden dann trotz günstiger Witterung abgeregelt und vom Netz genommen. In Deutschland gingen im Jahr 2020 6,1 TWh Energie durch das Abregeln von Windkraft- und Photovoltaikanlagen verloren (Bundesnetzagentur 2022). Wenn eine Netzeinspeisung nicht möglich ist, könnte dieser Strom gespeichert werden. Da Batteriespeicher kosten- und ressourcenintensiv sind,

werden alternative Speichermöglichkeiten diskutiert. Eine vielversprechende Möglichkeit ist die Produktion von H_2 aus Wasser.



Für diese Reaktion werden Elektrolyseure verwendet, deren Entwicklung und industrielle Fertigung Bestandteil aktueller Forschungsvorhaben sind (IPA 2022). Perspektivisch erlaubt dies den weiteren Ausbau von Wind- und Solarkraftanlagen, da saisonale Schwankungen und Netzengpässe abgedeckt werden können. Entsprechend der Qualität des Elektrolyseurs kann mit einem Wirkungsgrad zwischen 40 und 80 % für die Produktion von Wasserstoff gerechnet werden. So können im besten Fall 40 kWh eingesetzte Elektrizität genügen, um 1 kg Wasserstoff zu erzeugen (Sunfire 2022). Je nach verwendetem Elektrolyseur könnten so 2165 m³ Wasserstoff pro Stunde erzeugt werden (Sunfire 2022). Für die nachhaltige Herstellung von Wasserstoff aus Wasser eignen sich besonders alkalische oder Hochtemperatur-Elektrolyseure (Schalenbach et al. 2018; Hauch et al. 2008). Es wird prognostiziert, dass die Wirkungsgrade dieser Technologien noch weiter steigen und so die Ausbeute erhöht wird. Bei einem Wegfall fossiler Energieträger muss zusätzlich Wasserstoff importiert werden, da es perspektivisch in keinem Fall möglich ist, den Gesamtenergiebedarf für Deutschland mit Wasserstoff aus regional gewonnenen, erneuerbaren Energien zu decken. Hierzulande kann man jedoch auf die wirtschaftliche Entwicklung von Wasserstoff-Technologien setzen, welche den Import von Wasserstoff aus Ländern mit besonders hoher Produktion fördern. Für 2023 ist der Baustart mehrerer Wasserstoff-Terminals am Hamburger Hafen geplant, um von dort aus die Weiterverteilung zu organisieren (persönliche Kommunikation). Für eine hinreichende Versorgungssicherheit ist die Speicherung von Wasserstoff also unerlässlich.

1.2 Salzkavernen als Untergrundgasspeicher

Unterirdische Poren- und Kavernenspeicher werden weltweit für die Lagerung von großen Öl- und Gasvolumina genutzt (Tarkowski und Uliasz-Misiak 2021). Proportional mit der Tiefe steigt der lithostatische Druck auf den Hohlraum (Baker et al. 2015). Dies hat zur Folge, dass bei der Gasspeicherung ein Teil des Gases im Speicher verbleiben muss (Kissengas), um den Druck des umgebenden Gesteins auszugleichen (Lux 2009). Der sich aufbauende Druck und die allgemeine Stabilität des Speichers werden durch das umgebende Gestein bedingt. Porenspeicher in Kalk- und Sandstein, sind langsam zu befüllen, benötigen viel Kissengas

(> 50 %) und werden daher zur saisonalen Grundabsicherung befüllt (Sedlacek 2009). Kavernenspeicher zeichnen sich hingegen durch große Stabilität aus, die es erlaubt, mit besonders schnellen Ein- und Ausspeicherraten zu arbeiten und tagesaktuelle Bedürfnisse zu decken (Sedlacek 2009). Die physikalischen Eigenschaften von in der Erdkruste eingeschlossenem Salzgestein, entsprechen denen einer Flüssigkeit und somit bewegt sich Salzgestein in geologischen Zeiträumen plasto-elastisch in die Richtung des geringeren Drucks (Jenyon 1986). In Tiefen zwischen einigen 100 m und 2000 m, ist die Bewegung des Salzgesteins sehr langsam und ein entsprechender Gegendruck durch das Speichergas kann ihr entgegenwirken. Dies spiegelt sich in der Impermeabilität des Salzgesteins wider und macht Salzkavernen für die zukünftige Wasserstoffspeicherung besonders interessant (Cornet et al. 2018). In kleinerem Maßstab wird bereits im Vereinigten Königreich (210.000 m³) und in größerem Maßstab (580.000 m³) den USA Wasserstoff in Salzkavernen gespeichert (Caglayan et al. 2020). In Deutschland wurde der erste Untergrundgasspeicher (UGS) 1969 in einer Salzformation nahe Kiel angelegt. In den 1970ern folgten weitere, um einen nationalen Öl-Vorrat anzulegen. Später wurden diese Kavernen in Erdgasspeicher umgewidmet. Im Jahre 2009 waren in Deutschland Erdgas-Kavernenspeicher mit einem Gesamtvolumen von 10.777 Mio. m³ und einem maximalen Nutzgasvolumen von 8.059 Mio. m³ in Betrieb und 159 weitere, mit einem Gesamt-Nutzgasvolumen von 12.859 Mio. m³ in Planung (Sedlacek 2009). Kavernenspeicher in Nordeuropa befinden sich in einer Salzformation, welche durch die Evaporation des Zechsteinmeeres im späten Perm, vor rund 255 Jahrmillionen entstanden ist. Die Zusammensetzung des Salzgesteins spiegelt dabei die ursprüngliche Komposition der Minerale des Meeres wider, die während der Evaporation entsprechend ihrer Löslichkeit in einer Ausfällungsfolge präzipitierten. Auf schwer lösliche Karbonate folgten Gips und Natriumchlorid, welches mineralogisch auch als Halit bezeichnet wird. Diese Ausfällungsfolge wiederholte sich mehrmals, da zwischenzeitlich immer wieder Wasser durch Niederschläge oder Zuflüsse eingetragen wurde. Dies hatte zur Folge, dass das mengenmäßig überlegene Halit (> 90%) Inklusionen von Karbonat- und Sulfatsalzen enthält und eine Dicke bis zu 2 km aufweist (Geluk 2000; Zhang et al. 2013; Babel und Schreiber 2014). Kavernenspeicher in dieser Salzformation können entweder entleerte, natürlich entstandene Öl- und Erdgaslagerstätten sein, oder künstlich durch Aushöhlen des Salzgesteins mit Wasser erzeugt werden (Aussolen, Abbildung 1).

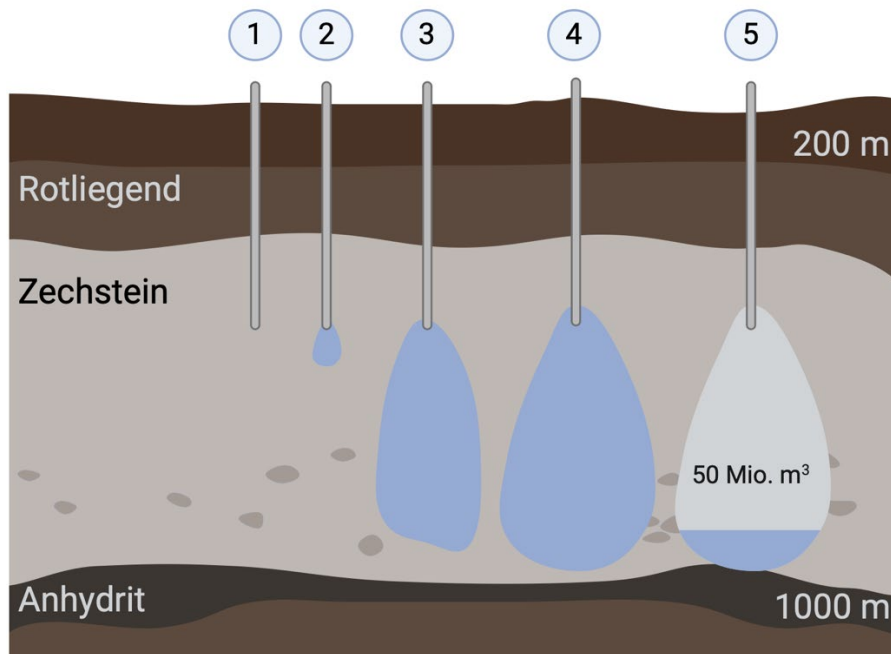


Abbildung 1 Der Solungsprozess: Entstehung einer Salzkaverne

Mit einer Tiefbohranlage wird zunächst bis in den unterirdischen Salzstock gebohrt. Nachdem der Bohrkern entfernt und das Bohrloch ummantelt ist, wird Wasser injiziert **(1)**. Dabei wird das umgebende Salzgestein bis zur Sättigungsgrenze gelöst. Die entstandene Sole wird dann aus der Kaverne verdrängt und durch Frischwasser oder Wasser mit geringerer Salinität ersetzt **(2)**. Dieser Prozess wird so oft wiederholt **(2-4)**, bis die Kaverne das Arbeitsvolumen erreicht hat. Im letzten Schritt wird die Sole durch das Speichergas aus der Kaverne verdrängt, wobei ein Sumpf am Boden der Kaverne zurückbleibt **(5)**. Die Abbildung wurde VNG Gasspeicher GmbH angepasst.

Für die Aussolung wird ein einziges Bohrloch verwendet, durch welches Frischwasser in das Salzgestein injiziert wird und dieses auflöst. In einem nächsten Schritt wird die dadurch entstandene Dicksole gegen Frischwasser oder Dünnssole (Wasser mit geringerem Salzgehalt) ausgetauscht. Dieses Vorgehen wird so lange wiederholt, bis der entstandene Hohlraum ein durchschnittliches Volumen zwischen 100.000 m³ und 1.000.000 m³ erreicht hat. Dementsprechend kann sich die Aussolung über einen langen Zeitraum erstrecken, der zusätzlich von der Verwertung der entstehenden Dicksole bedingt ist. Bereits während der Aussolung kann Speichergas in der Kaverne gelagert werden, um so den Wasserverbrauch zu verringern. Dieser Prozess und natürlich auch das Salzgestein selbst, sind nicht steril. Mikroorganismen können über das Formationswasser und Speichergas oder aus dem Salzgestein selbst in die Kaverne eingetragen werden und dort Einfluss auf das Ökosystem nehmen.

1.3 Halophile Mikroorganismen

Über 68 % der Erdoberfläche sind von Meeren und Salzseen bedeckt und damit ein Habitat für halophile Mikroorganismen. Lokale Salzkonzentrationen können in Abhängigkeit von Temperatur und Niederschlag stark unterschiedlich sein und reichen von durchschnittlich 0,6 M NaCl (3,5 %) im Meerwasser, bis hin zur Sättigung von 6,3 M (35 - 37 %) wie im Gaet'ale See in Äthiopien oder in Salinen (Pérez und Chebude 2017; Antón et al. 2000). Neben den oberirdischen Seen und Ozeanen bieten auch saline Aquifere und hypersaline Solebecken im Meer einen Lebensraum für halophile Mikroorganismen. Die Fähigkeit bei hohen Salzgehalten zu wachsen, findet sich in Mikroorganismen verschiedener phylogenetischer Gruppen in allen drei Domänen. Dabei lassen sich halophile und halotolerante Mikroorganismen unterscheiden. Halotolerante Mikroorganismen benötigen keine erhöhten Salzkonzentrationen, können diese aber bis zu bestimmten Konzentrationen tolerieren. Halophile Mikroorganismen hingegen sind auf erhöhte Salzgehalte angewiesen und können ohne diese ihre zellulären Strukturen nicht aufrechterhalten. Des Weiteren können Halophile entsprechend ihres Wachstumsoptimums in leicht, moderat und extrem halophil eingeteilt werden. Leicht halophil ist ein Großteil der Meerwasserbakterien (bis 0,5 M NaCl), moderat halophile finden sich bei Salzkonzentrationen bis 2,5 M und extrem halophile Mikroorganismen bei Salzkonzentrationen bis hin zur Sättigung (Oren 2006).

1.3.1 Mikrobielle Anpassungsstrategien an erhöhte Salzgehalte

Die konservierenden Eigenschaften von Salz sind allgemein bekannt. Dies wirft die Frage auf, welche Möglichkeiten halophile Mikroorganismen haben, um unter hypersalinen Bedingungen zu wachsen. Prokaryonten grenzen sich mit ihrer Biomembran von der Außenwelt ab (Csonka und Hanson 1991). Diese wird entweder durch eine zweite Biomembran mit einer zwischengelagerten dünnen Mureinschicht (gram-negative Bakterien) bzw. durch eine quervernetzte Polymerschicht (gram-positive Bakterien und Archaeen) unterstützt (Albers und Meyer 2011). Biologische Membranen sind aus Polylipiden in einer Doppelschicht aufgebaut und permeabel für Wasser, nicht aber für geladene Teilchen oder große Moleküle. Durch eine unterschiedliche Wasseraktivität im umgebenden Medium entsteht ein osmotischer Druck auf die mikrobielle Zelle. Um kein Wasser zu verlieren und um einen positiven Turgor aufrecht zu erhalten, muss dem osmotischen Druck entgegengewirkt werden (Whatmore und Reed 1990). Im Falle eines salzhaltigen Mediums muss die Zelle also

in ihrem Cytoplasma eine erhöhte Konzentration an Ionen oder anderen osmoaktiven Substanzen wie Zuckern einlagern, die den osmotischen Druck ausgleichen und so einer Lyse der Zellen durch Wasserverlust vorbeugen (Galinski 1995). Anpassungsstrategien beinhalten entweder die Akkumulierung von (i) kleinen, organischen Molekülen (Galinski 1993; Roberts 2005) oder (ii) monovalenten Ionen (Rengpipat et al. 1988). Die in Strategie (i) verwendeten Moleküle sind unter anderem Ectoin, Glycerol, Fructose, Glycin-Betain oder Trehalose, die unter Verbrauch des energiereichen Moleküls Adenosintriphosphat (ATP) aufgenommen oder synthetisiert werden (Csonka und Hanson 1991). Da in diesem Fall keine Salze im Zellinneren akkumulieren, wird diese Strategie im Englischen auch als „salt-out“ Strategie (*Salz aus der Zelle befördern/ außerhalb der Zelle halten*) bezeichnet (Oren 1999). Mikroorganismen mit dieser Anpassungsstrategie sind vorwiegend Hetero- oder Phototrophe, die jeweils ein breites Spektrum an Salzkonzentrationen tolerieren können (Vreeland et al. 1980; Galinski und Trüper 1982; Welsh et al. 1996). Die andere bekannte Anpassungsstrategie basiert auf der Aufnahme von Salzen bzw. Ionen aus dem umgebenden Medium in das Cytoplasma und wird im Englischen als „salt-in“ Strategie bezeichnet (Gunde-Cimerman et al. 2018). Halophile Archaeen nehmen selektiv Kalium- und Chlorid-Ionen auf und halten intrazelluläre Natriumkonzentrationen auf geringem Niveau. Die Gesamtkonzentration der intrazellulären Ionen entspricht dann der des umgebenden Mediums. Besonders bemerkenswert ist die Akkumulation von Kalium in molaren Konzentrationen, auch wenn der Anteil von Kalium im Medium geringer als 1 mM ist (Oren 2006). Es wird angenommen, dass sich die hohe intrazelluläre Konzentration von Ionen auf die Löslichkeit von Enzymen auswirkt (Gunde-Cimerman et al. 2018). Durch den hohen Ionengehalt ist zum einen die intrazelluläre Wasserverfügbarkeit verringert, zum anderen können ionische Wechselwirkungen auftreten (Vauclare et al. 2015). Um eine Hydratisierungshülle aufrecht zu erhalten, sind an den Außenseiten der Enzyme vermehrt die sauren Aminosäuren Asparagin und Glutamin und verringert hydrophobe Aminosäuren eingebaut, was den isoelektrischen Punkt (pI) des Proteoms zu niedrigeren Werten (Median bei 5,0 bis 6,3) verschiebt (Reistad 1970; Oren 2013; Deole et al. 2013). Die Salzoptima für das Wachstum verschiedener *Halobacteria* liegen bei mehr als 2,4 M NaCl bis hin zur Sättigung (Oren et al. 2009). Verändert sich die Salzkonzentration im Medium kurzfristig, sind halophile Archaeen mit dieser Anpassungsstrategie vulnerabler, da die stabilisierenden Wechselwirkungen wegfallen und die Funktionalität der Proteine und Enzyme eingeschränkt

ist (Vauclare et al. 2015; Vauclare et al. 2020). Es finden sich aber auch Beweise für halophile Proteobakterien, die mit einem entsprechend sauren Proteom und bei geringen extra- und intrazellulären Salzkonzentrationen wachsen (Deole et al. 2013). Halophile, anaerobe Bakterien der Ordnung *Halanaerobiales* (Firmicutes) hingegen nehmen neben Kalium- und Chlorid- auch Natrium-Ionen auf und haben einen Proteom-pI von 6,3 bis 7,4 (Oren 2014). So kann angenommen werden, dass Vertreter dieser Anpassungsstrategie weniger sensitiv auf Veränderungen in der Salzkonzentration des Mediums reagieren. In der Tat wachsen *Halanaerobium praevalens* und *H. hydrogeniformans* bei Salzkonzentration von 0,3 bis 2,4 M NaCl (Ivanova et al. 2011; Brown et al. 2011).

1.3.2 Habitate salzliebender Mikroorganismen

Hypersaline Habitate werden entsprechend ihrer ionischen Zusammensetzung, in thalassohaline und athalassohaline Systeme unterteilt. In thalassohalinen Systemen ist Meerwasser die Grundlage der ionischen Zusammensetzung, welche durch Wasserevaporation erhöht ist (Oren 2006). In athalassohalinen Systemen, meist Seen, die in Senken unterhalb des Meeresspiegels liegen, sammelt sich Grundwasser, das Ionen aus dem umliegenden Gestein löst. Ein Beispiel ist das Tote Meer, aus dem der Modelorganismus *Haloferax volcanii* isoliert wurde (Mullakhanbhai und Larsen 1975). Einen Sonderfall nehmen Soda-Seen ein, in denen CO₂-haltiges Grundwasser Natrium-Ionen aus den umgebenden Gesteinsschichten löst. Diese sind arm an bivalenten Kationen, so dass sich keine MgCO₃ und CaCO₃ Präzipitate bilden und sich ein natürliches Karbonat-Bikarbonat-Puffersystem mit hohen Natriumkonzentrationen und hohem pH-Wert einstellt - ein Lebensraum für Haloalkaliphile (Oren 2006; Sorokin et al. 2014b; Jones et al. 1998).

Salzgewinnungsstätten und Salzseen sind thalassohaline Systeme. Zahlreiche Modellorganismen wie *Salinibacter ruber* konnten aus diesen Habitaten gewonnen werden (Antón et al. 2002). Sie sind durch eine hohe Sonneneinstrahlung gekennzeichnet und die Primärproduktion ist besonders hoch. Die Sonnenenergie kann weiterhin für die Energiegewinnung und Transporter-Funktion genutzt werden. Diese günstigen Faktoren erlauben besonders hohe Zellzahlen, die sich in manchen Fällen in einer Rotfärbung der Ökosysteme widerspiegeln. Hinzu kommen schwankende Salzkonzentrationen. Viele der Mikroorganismen, die in diesen Habitaten gefunden wurden, gehören zu den

phylogenetischen Gruppen der *Halobacteria*, *Bacteroidota*, *Proteobacteria* und *Cyanobacteria* (Benlloch et al. 2002).

Unabhängig von der Ionenzusammensetzung nimmt bei steigenden Salzkonzentrationen die mikrobielle Diversität ab. Spezies, welche bei Salzkonzentrationen über 25 % dominieren, sind meist Archaeen (*Euryarchaeota*), *Delta*- und *Gammaproteobacteria* (Vavourakis et al. 2016; Benlloch et al. 2002). Obwohl die mikrobielle Diversität bei erhöhten Salzkonzentrationen eingeschränkt ist, zeichnen sich hypersaline Habitats durch eine hohe Biomasseproduktion und hohe Stoffumsätze aus (Foti et al. 2008).

1.4 Durch Wasserstoff induzierbare mikrobielle Stoffwechselvorgänge

Salzkavernen, welche in Deutschland als UGS verwendet werden, liegen in der Zechsteinformation und sind thalassohalinen Ursprunges. Die chemische Zusammensetzung des Salzgesteins besteht also maßgeblich aus NaCl, Karbonat- und Sulfatsalzen. Ob weitere, weniger abundante Substrate oder Spurenelemente für den mikrobiellen Stoffwechsel zur Verfügung stehen, ist weitgehend unbekannt. Eine Studie von Bordenave und Kollegen (Bordenave et al. 2013) bestätigt jedoch, dass Mikroorganismen aus solchen Habitats angereichert werden können. Ob Mikroorganismen in Kavernen metabolisch aktiv und teilungsfähig sind oder ob sie in einem Ruhezustand vorliegen, ist unklar. Salzkavernen sind von Phototrophie ausgeschlossen, daher hängt die Primärproduktion von der Aktivität lithotropher Mikroorganismen ab. Während der Speicherung von Erdgas ist die anaerobe Oxidation von Methan mit Sulfat als Elektronenakzeptor, eine wesentliche Möglichkeit der Energiegewinnung. Ob weitere Elektronen zur Verfügung stehen ist unklar, da dies bisher noch nicht untersucht wurde. Mit zukünftiger H₂ Speicherung in Salzkavernen wird in großen Mengen ein universeller Elektronendonator in das System eingetragen. Energiekonservierung kann dann über Sulfat- und CO₂-Reduktion, wie Methano- und Acetogenese erfolgen und das Wachstum lithoautotropher Mikroorganismen nach sich ziehen. Diese Reaktionen sind in Abbildung 2 zusammengefasst und werden in den folgenden Abschnitten näher betrachtet.

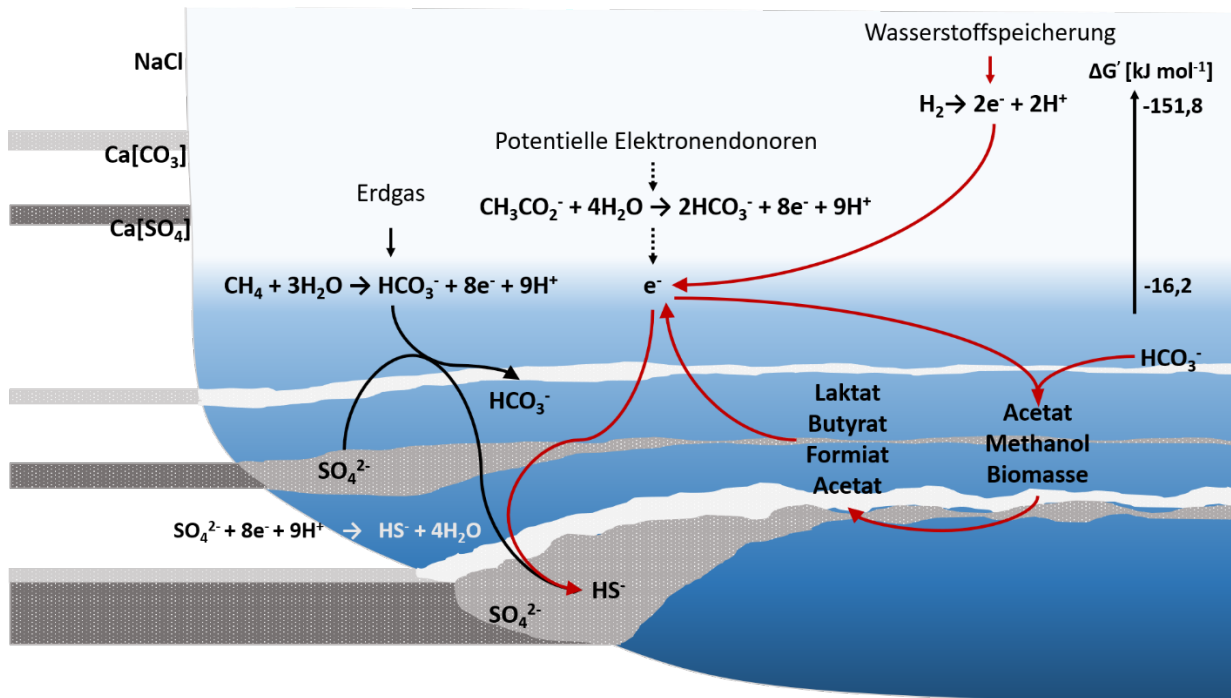


Abbildung 2 Potentielle mikrobielle Stoffwechselprozesse in Salzkavernen

Die Untergrundspeicherung von H₂ erweitert die Möglichkeiten für mikrobielle Stoffwechselwege, da die Oxidation von H₂ energetisch effizienter ($-151,8 \text{ kJ mol}^{-1}$) ist als die Oxidation von Methan ($-16,2 \text{ kJ mol}^{-1}$). Für die Berechnung wurde Sulfat als Elektronenakzeptor und die Werte für die Gibbs'sche freie Bildungsenergie nach Thauer et al. (1977) verwendet. Die Abbildung wurde modifiziert von (Schwab et al. 2022).

1.4.1 Wasserstoffoxidation

Für die Verwendung von Wasserstoff als Elektronendonator haben sich in allen Lebewesen verschiedene Hydrogenasen entwickelt (Vignais et al. 2001; Greening et al. 2016). Sie katalysieren reversibel die Wasserstoffoxidation von H₂ in zwei Protonen (H⁺) und zwei Elektronen (e⁻) (Schwartz und Friedrich 2006).

H₂ oxidierende Mikroorganismen verfügen über zum Periplasma ausgerichtete, membranständige oder cytosolische Hydrogenasen, in deren aktiven Zentren entweder [NiFe], [NiFe(Se)] oder [Fe] Atome für die heterolytische Spaltung von H₂ koordiniert sind (Vignais et al. 2001; Siegbahn und Liao 2020). In SRBS wurden überwiegend membranständige Cytochrome als direkte Redoxpartner identifiziert (Bianco et al. 1992; Rossi et al. 1993), während in Acetogenen lösliches Ferredoxin und membrangebundene Cytochrome und Menaquinone und in Methanogenen Coenzym F420 gefunden wurden (Thauer et al. 1996;

Schuchmann und Müller 2014). Bei der schrittweisen Übertragung der Elektronen auf den finalen Elektronenakzeptor mit positiverem Reduktionspotential wird Energie frei, die durch den Aufbau eines elektrochemischen Gradienten konserviert wird (Thauer et al. 1977). Dabei werden Na^+ und H^+ Ionen aus dem Zellinneren ins Periplasma geschleust, um deren Wiedereintritt in das Cytoplasma für die Synthese von ATP zu nutzen (Schulz et al. 2013; Mitchell 1961).

1.4.2 Sulfatreduktion

In Salzkavernen ist die Verfügbarkeit von Sulfat als Elektronenakzeptor nicht limitiert, da das Salzgestein zu hohen Anteilen aus Gips und Anhydrit besteht. Für die Sulfatreduktion (Abbildung 3 A) muss 1 M Sulfat mit 1 M ATP zu Adenosinphosphosulfat (APS) aktiviert werden. Erst dann kann die zweistufige Reduktion über den APS Reduktase Komplex (AprAB) und die dissimilatorische Sulfitreduktase (DsrABC) zu Sulfid erfolgen. Sowohl AprAB als auch DsrABC sind über den QmoABC bzw. DsrMKJOP Komplex mit der Membran verbunden und eine Energiekonservierung mittels Chemiosmose ist denkbar (Rabus et al. 2015). Das in diesem Prozess entstehende HS^- Gas ist humantoxisch und korrosiv, daher wird der Prozess der Sulfidproduktion auch als indirekte, mikrobielle Korrosion bezeichnet (Enning und Garrelfs 2014).

1.4.3 Homoacetogenese

Neben Sulfat- sind Karbonationen mögliche finale Akzeptoren für Elektronen aus der H_2 Oxidation. Die Elektronen werden über den Wood Ljungdahl Weg (engl. *Wood Ljungdahl Pathway*, WLP) mit zwei Molekülen CO_2 , über zwei Routen in einem Molekül Acetat vereint (Ljungdahl 1969). Im Detail wird, wie in Abbildung 3 B vereinfacht dargestellt, ein Molekül CO_2 mit einem Molekül H_2 über das Enzym Formiatdehydrogenase in Formiat umgewandelt. Unter ATP-Verbrauch erfolgt im nächsten Schritt die Übertragung von Formiat auf Tetrahydrofolat und in drei Schritten die Umwandlung in eine Methylgruppe, die dann auf ein Coenzym übertragen wird. Dabei werden zwei Moleküle NADH oxidiert. Über den zweiten Weg, dem Carbonyl-Weg, wird CO_2 in CO umgewandelt, welches dann mit der Methylgruppe und Coenzym A über den Kohlenstoffmonoxid-Dehydrogenase-Komplex in Acetyl-Coenzym A (Acetyl-Co A) vereint wird. (Drake et al. 2006). Netto wird kein ATP auf direktem Weg gewonnen, aber mehrere energiekonservierende Enzyme wurden in Acetogenen gefunden.

Eine Ferredoxin:NAD⁺ Oxidoreduktase, eine Ferredoxin-abhängige, energiekonservierende Hydrogenase (engl. *Energy conserving hydrogenase, Ech*) sowie die vor Kurzem postulierten Verknüpfung von Methylentetrahydrofolat-Reduktase mit der Elektronentransportkette (Kremp et al. 2022).

1.4.4 Methanogenese

Karbonationen können auch als finale Elektronenakzeptoren für methanogene Archaeen dienen (Kurth et al. 2020), jedoch ist bei hohen Salzkonzentrationen von einer thermodynamischen Inhibierung der Methanogenese auszugehen. Hydrogenotrophe und acetoklastische Methanogenese sind bereits ab NaCl-Konzentrationen von 2 M inhibiert, während methylootrophe Methanogenese bei NaCl Konzentrationen bis 4,3 M nachgewiesen wurde (Oren 2011). Diese Prozesse sind in Abbildung 3 C zusammengefasst.

1.4.5 Kohlenstofffixierung

Die Verfügbarkeit von Kohlenstoffquellen (C Quellen) in Salzkavernen ist unbekannt. Über Homoacetogenese gebildetes Acetat kann eine C Quelle darstellen, aber Autotrophie spielt eine zentrale Rolle. Neben dem WLP (auch reduktiver Acetyl-CoA Weg), sind folgende Möglichkeiten der mikrobiellen CO₂ Fixierung beschrieben. Diese sind der Calvin Zyklus (CZ), der reduktive Zitronensäure Zyklus (engl. *reverse tricarboxylic acid cycle, rTCA*), der 3-Hydroxypropionat-Bizyklus (HP), der Hydroxypropionat-Hydroxybutyrat-Zyklus (HH) und der Dicarboxylat-hydroxybutyrat Zyklus (DH) (Berg et al. 2010; Fuchs 2011). Zentraler Metabolit ist in allen Fällen Acetyl-CoA.

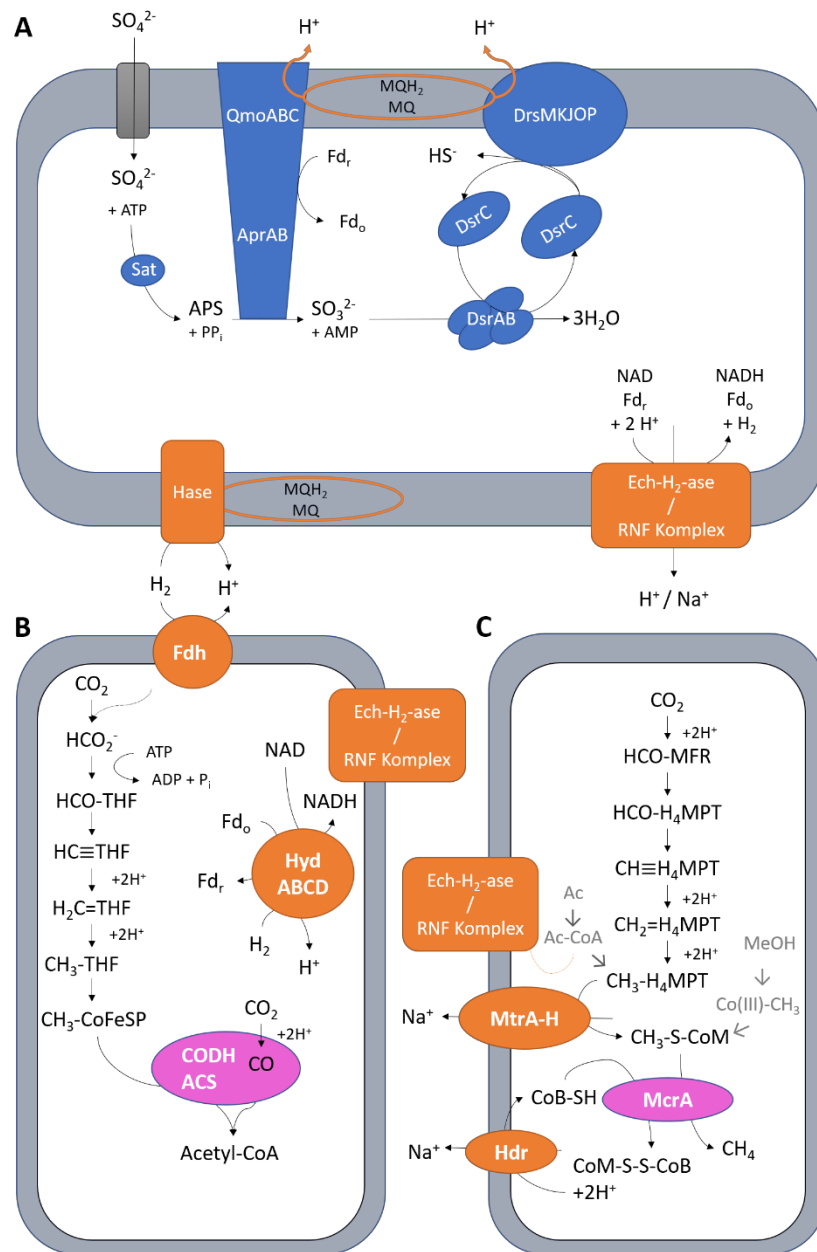


Abbildung 3 Durch H₂ induzierbare mikrobielle Stoffwechselprozesse

A: Sulfatreduktion **B:** Homoacetogenese **C:** Methanogenese. In orange dargestellt sind energiekonservierende Enzyme bzw. Prozesse, von denen eine Energiekonservierung angenommen wird. Die Grafik stellt eine Vereinfachung nach Rabus et al. (2015), Schuchmann und Müller (2014) und Kurth et al. (2020) dar. Der sich aufbauende Protonengradient kann über den ATP-Synthase Komplex zur oxidativen Phosphorylierung genutzt werden.

1.5 Methoden zur Charakterisierung von mikrobieller Diversität und Aktivität

Um die Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaft und deren Metabolismus umfassend zu charakterisieren, bieten sich verschiedene kultivierungs-unabhängige

Methoden an. Molekularbiologische Methoden ermöglichen die taxonomische Zuordnung von Mikroorganismen in Proben unbekannter Zusammensetzung und erlauben Rückschlüsse auf deren metabolisches Potential (Abschnitt 1.5.1). Mikrobielle Aktivität kann jedoch nur über Stoffumsätze nachgewiesen werden. Hierfür eignen sich Versuchsansätze, in welchen stabile Isotope als Tracer eingesetzt werden oder mikrobiell-bedingte Fraktionierung der natürlichen Isotopenhäufigkeit gemessen wird (Abschnitt 1.5.2).

1.5.1 Molekularbiologische Methoden zur Charakterisierung mikrobieller Diversität

Bei geringen Mengen verfügbaren DNA-Materials, können einzelne Genabschnitte zunächst amplifiziert und dann sequenziert werden (Amplikon-Sequenzierung). Eine Übersicht über die mikrobielle Diversität einer Probe liefert die Sequenzierung des Gens für die kleine Untereinheit der ribosomalen RNA (16S rRNA), die einen aussagekräftigen phylogenetischen Marker darstellt (Pace 1997; Caporaso et al. 2011). Eine initiale Amplifikation des 16S rRNA-Gens erfolgt über Polymerase-Kettenreaktion (engl.: *polymerase chain reaction*, PCR) und stellt sicher, dass auch aus Proben, aus welchen besonders wenig DNA (< 50 ng) extrahiert wurde, eine ausreichende Sequenzinformation gewonnen werden kann. Diese Methode bietet sich an, um die mikrobielle Diversität von Proben mit begrenztem Volumen und geringer Zellzahl zu untersuchen.

Um jedoch die gesamte genomische Information einer Probe, das Metagenom, zu analysieren, muss bei der DNA-Extraktion zunächst darauf geachtet werden, dass hochmolekulare, wenig fragmentierte DNA von > 50 ng zur Verfügung steht. Die DNA wird dann gezielt fragmentiert und jedes Fragment sequenziert. Mit zahlreichen bioinformatischen Programmen können die DNA-Fragmente nach der Sequenzierung sequenzspezifisch zusammengefügt und so ein Gerüst-Genom von 1000 Basenpaaren erstellt werden (Nurk et al. 2017). Anhand des Gerüstgenoms werden die Genome, der in der Probe vorhandenen Mikroorganismen, rekonstruiert (Kang et al. 2019).

1.5.2 Isotopenchemische Methoden zur Charakterisierung mikrobieller Aktivität

Isotope sind Atome eines Elements, deren Atomkerne die gleiche Protonenanzahl (gleiche Ordnungszahl), jedoch eine unterschiedliche Anzahl an Neutronen aufweisen. Die Masse eines Neutrons gleicht in etwa der Masse eines Protons (1,007 bzw. 1,008 u), somit unterscheiden sich Isotope eines Elements in ihrem Gewicht. Isotope, die keinem

radioaktiven Zerfall unterworfen sind, werden als stabile Isotope bezeichnet. Sie existieren in unterschiedlichen, natürlichen Häufigkeiten (Abundanz, Tabelle 1) (Alexandre 2020).

Tabelle 1 Massen und relative Abundanz von Wasserstoff- und Kohlenstoffisotopen
 Jeweils zwei stabile Isotope existieren für H und C. Die schwereren und weniger abundanten Isotope bieten sich für den Einsatz als biologische Tracer an. Tabellenwerte nach Alexandre (2020).

Ordnungszahl	Name	Symbol	Atomare Masseneinheit [amu]	Relative Abundanz [At. %]
1	Wasserstoff	¹ H	1,007825	99,9885
		² H	2,014102	0,0115
6	Kohlenstoff	¹² C	12,000000	98,93
		¹³ C	13,003355	1,07

Diese stabilen Isotope können zum Nachweis von Prozessen, wie biotischen Reaktionen verwendet werden, da sich im Progress dieser Prozesse das Verhältnis der Isotope verändert. Dieser Effekt wird als Isotopenfraktionierung bezeichnet. Mit ausreichend sensitiven Spektrometern lassen sich diese Unterschiede messen. Für die Applikation im Bereich der Mikrobiologie sind für diese Arbeit zwei Konzepte von besonderem Interesse und für den Nachweis und die Quantifizierung mikrobieller Aktivität nutzbar. Zum einen verschiebt die mikrobielle Aktivität das Verhältnis der leichten und schweren Isotope zueinander (Abschnitt 1.5.2.1), zum anderen können isotopisch angereicherte Substrate als Tracer (engl. *stable isotope probing*, SIP) für mikrobielle Stoffumsätze bzw. für die metabolische Inkorporation in die Biomasse eingesetzt werden (Abschnitt 1.5.2.2). Auf beide Methoden wird im Folgenden näher eingegangen.

1.5.2.1 Isotopenfraktionierung

Die unterschiedliche Anzahl der Neutronen im Kern wirkt sich auf die Bindungsenergien der Atome in Molekülen aus. Unterliegen diese Moleküle einer chemischen Reaktion die in einer Bindungsspaltung resultiert, kann das Vorhandensein von schweren bzw. leichten Isotopen an dieser reaktiven Position Auswirkungen haben. In der Regel werden hierbei Verbindungen mit leichten Isotopen in der reaktiven Position präferentiell umgesetzt. In geschlossenen Systemen können diese Werte der natürlichen Häufigkeit durch biologische oder abiotische Aktivität abweichen. Viele anaerobe Mikroorganismen nutzen Wasserstoff als Elektronendonator. Für das Sulfat-reduzierende Bakterium *Desulfovibrio vulgaris* wurde

gezeigt, dass die mikrobielle Wasserstoffoxidation zu einer signifikanten Verschiebung im Verhältnis von $^1\text{H}_2$ zu $^1\text{H}^2\text{H}$ führt (Löffler et al. 2019).

$$^2\text{H} = 100 * [^2\text{H}/(^1\text{H}+^2\text{H})] \quad (1)$$

$$^2\text{R} = ^2\text{H}/^1\text{H} \quad (2)$$

$$^2\text{F} = ^2\text{H}/(^1\text{H}+^2\text{H}) = \text{R}/(\text{R}+1) \quad (3)$$

Bei der natürlichen Wasserstoff-Isotopen Fraktionierung wird mikrobielle Oxidation von H_2 untersucht. Die Reaktion basiert auf der reversiblen Oxidation von Wasserstoff durch Hydrogenasen. Bevorzugt werden Moleküle aus leichtem Wasserstoff (^1H) gegenüber schwerem Wasserstoff (^2H). Gleichzeitig ist die Bindung von Deuterium in Wassermolekülen stabiler als in gasförmigen H_2 , was zur Folge hat, dass die Isotopensignatur in der Gasphase insgesamt leichter wird. Die Analyse der Isotopensignatur erfolgt nach Auftrennung der Gase im Gaschromatographen durch ein Massenspektrometer.

1.5.2.2 Bildgebende nano-scale Sekundär-Ionen-Massenspektrometrie: nanoSIMS

Weniger abundante stabile Isotope, können künstlich angereichert und dann zur Synthese von Verbindungen genutzt werden. So können organische Verbindungen erzeugt werden, deren Kohlenstoff- oder Stickstoffanteil zu mehr als 99 % aus dem jeweiligen schwereren Isotop besteht. Als Substrate eingesetzt, werden diese Verbindungen in die mikrobielle Biomasse inkorporiert (engl. *stable isotope probing*, SIP). Die Assimilation in die mikrobielle Biomasse wird dann als Nachweis mikrobieller Aktivität interpretiert und somit zum Verständnis von biogeochemischen Stoffflüssen verwendet. Zuerst wurden ^{13}C angereicherten Kohlenstoffquellen verwendet, um deren Einbau entweder in mikrobielle Phospholipide (Boschker et al. 1998) oder DNA (Radajewski et al. 2000) nachzuweisen wurde und die gleichzeitige taxonomische Zuordnung der assimilierenden Mikroorganismen zu realisieren. Mit dem Aufkommen von hochauflösenden Sekundärionen-Massenspektrometern (nanoSIMS), die für die Oberflächenanalyse entwickelt wurden, können nun auch Assimilationsraten und Aktivitäten auf Einzelzellebene untersucht werden (Kuypers & Jørgensen 2007, Musat et al. 2008, Orphan & House 2009, Musat et al. 2012). Einzelzell-SIP-Experimente wurden erfolgreich eingesetzt um z. B. aktive Mikroorganismen an Tiefsee-Hydrothermalquellen (Trembath-Reichert et al. 2019, Winkel et al. 2014) und in der tiefen Biosphäre (Jakus et al. 2021, Trembath-Reichert et al. 2017, Meyer et al. 2024, Morono

et al. 2019) zu charakterisieren. Methoden, die auf der Analyse von Sekundärionen beruhen, benötigen eine spezielle Probenvorbereitung, da die Generation der Sekundärionen im Ultrahochvakuum (UHV, $\sim 10^{-8}$ Pa) erfolgt. Dies setzt voraus, dass das Probenmaterial dehydriert und vakuumtauglich ist. Im Falle von mikrobiellen Zellen, muss deren molekulare und morphologische Architektur zunächst fixiert, immobilisiert und dehydriert werden. So werden Ionen unterschieden, die sich um ca. 0,001-0,005 amu (von dem Massenbereich abhängig) unterscheiden und selektiv ausgewählt werden. Der nanoSIMS Analysenvorgang erfolgt pixelweise im bildgebenden Modus. Die Fähigkeit des nanoSIMS, derart feine Unterschiede, wie isobarische Interferenzen von ^{13}C und $^{12}\text{C}^1\text{H}$ (beide 13 amu) aufzulösen, wird im Englischen als *Mass-Resolving-Power* (MRP) bezeichnet und ist mit der kleinsten erkennbaren Massendifferenz dM rund um die Masse M als $\text{MRP} = M/dM$ definiert. Typische MRP-Werte für ein serielles nanoSIMS Gerät liegen innerhalb des $8 \times 10^3 - 12 \times 10^3$ Bereiches. Die durch den Beschuss entstehenden und für diese Arbeit wichtigen Ionenverhältnisse sind $^{12}\text{C}^{14}\text{N}^- / ^{13}\text{C}^{14}\text{N}^-$, $^1\text{H}^- / ^2\text{H}^-$ und $^{12}\text{C}_2^2\text{H}^- / ^{12}\text{C}_2^1\text{H}^-$. Das heißt, die Auftrennung des Masse-zu-Ladungsverhältnisses m/z erfolgte über einen Masseunterschied von 1 bis 27 und unterstreicht die Notwendigkeit mobiler Kollektoren und einer hohen MRP. Gleichzeitig werden neben den Sekundärionen auch Sekundärelektronen erzeugt. Mit diesen kann, ähnlich dem Funktionsprinzip eines Rasterelektronenmikroskops (SEM), ein Bild erzeugt werden. So werden mikrobielle Zellen auch im Sekundärelektronensignal visualisiert und können als „Regionen von Interesse“ (engl. *Region of Interest*, ROI) definiert werden. Mit einer speziellen Software, „Look at nanoSIMS (LANS, (Polerecky et al. 2012))“, kann dann die Auswertung und Ermittlung der Isotopenverhältnisse in diesen ROIs erfolgen, sowie Unterschiede zwischen Zellen herausgearbeitet und Isotopenverhältnisse berechnet werden. Neben der hohen Sensitivität der Messung, ist der Einsatz zum Nachweis mikrobieller Aktivität in Proben mit geringen Zellzahlen hervorzuheben.

1.6 Motivation und Hypothesen

Eine sichere Zwischenspeicherung von erneuerbarem Wasserstoff-Gas ist essenzieller Bestandteil der Energiewende. Dafür kommen Salzkavernen infrage, die momentan neu errichtet werden oder durch Umrüstung von Erdgaskavernen entstehen. Verlust von Wasserstoff-Gas durch nicht ausreichend dichte Speicher und Rohre wird als größte Gefahr für das Speichergut angesehen. Hinzu können Veränderungen der Gasqualität und -quantität kommen, die direkt und indirekt durch mikrobiologische Prozesse induziert werden. Diese sind:

- I. Produktion von Schwefelwasserstoff aus Sulfatsalzen und Wasserstoff
- II. Acetogenese und Methanogenese aus Karbonatsalzen und Wasserstoff
- III. Gasverlust durch mikrobiell induzierte Korrosion der Anlagenteile

Der aktuelle Stand der Forschung umfasst eine Studie zur Beschreibung mikrobieller Gemeinschaftsstrukturen in kanadischen Salzkavernen, die für die Lagerung von kontaminiertem Sand genutzt werden oder geplant sind (Bordenave et al. 2013). Diese publizierte Arbeit bestätigt zum einen die Anwesenheit von Mikroorganismen in Salzkavernen und zum anderen Kultivierbarkeit in Medien mit verringertem Salzgehalt. Weitergehende Informationen bezüglich mikrobieller Diversität oder Stoffwechselprozesse in Kavernenspeichern liegen derzeit nicht vor. Rückschlüsse können zwar aus Erfahrungen mit Porenspeichern und salinen Aquiferen gezogen werden, doch sind diese Vergleiche aufgrund der physikalisch-chemischen Bedingungen in Salzkavernen und der mikrobiellen Interaktionen mit dem gespeicherten Wasserstoff-Gas nicht direkt übertragbar. Um die oben gelisteten, möglichen mikrobiologischen Diversitäten und Prozesse zu untersuchen und um eine Risikobewertung für die zukünftige Wasserstoff-Gasspeicherung in lokalen Salzkavernen zu ermöglichen, sollen auf Grundlage von vier Hypothesen folgende Fragestellungen beantwortet werden:

H1: Salzkavernen sind von Mikroorganismen besiedelt. Die extremen Bedingungen des hohen Salzgehaltes, des Druckes und das nicht bekannte, aber voraussichtlich limitierte Nährstoffangebot, beschränken die mikrobielle Diversität in Kavernen eines Speicherstandortes.

- H1-I. Wie hoch sind die mikrobiellen Zellzahlen in der Sole des Kavernensumpfes?

- H1-II. Gibt es in der Kavernensole weitere Kohlenstoffquellen neben Karbonat?
- H1-III. Unterscheiden sich die mikrobiellen Gemeinschaften in Abundanz und Diversität zwischen den Kavernen an einem Speicherstandort?
- H1-IV. Wenn ja, gibt es ein zentrales Solemikrobiom?

H2: Hohe Salzkonzentrationen limitieren die mikrobielle Aktivität, aber ein Eintrag von Wasserstoff-Gas in die Kavernenspeicher liefert einen zusätzlichen energieeffizienten Elektronendonator für die Mikroorganismen. Dies unterstützt die Aktivität und Proliferation von autotrophen Mikroorganismen. Die entstehenden Abbauprodukte (z.B. Acetat), sowie die verbleibende mikrobielle Biomasse, begünstigen damit auch das Wachstum von heterotrophen Mikroorganismen. Sowohl autotrophe (Wasserstoffgaszehrung durch Homoacetogenese und Sulfatreduktion) als auch heterotrophe Prozesse (Wasserstoffgaszehrung durch Sulfatreduktion), gefährden die Gasspeicherung. Diese Gefährdung beinhaltet die Korrosion der Anlagenteile entweder indirekt, durch Produktion von korrosivem Schwefelwasserstoff oder direkt, durch mikrobielle Eisenoxidation des verbauten Stahls. In Laborversuchen werden folgende Fragen mit den Soleproben aus den Kavernen beantwortet.

- H2-I. Wird Wasserstoff-Gas von den in den Soleproben befindlichen Mikroorganismen verstoffwechselt?
- H2-II. Wie wirkt sich das Vorhandensein von Wasserstoff-Gas auf mikrobiell induzierte Korrosion an Eisenprüfkörpern in ausgewählten Soleproben aus?

H3: Die unter hypersalinen Bedingungen verlangsamte Teilungsrate erschwert eine klare Differenzierung zwischen mikrobieller Proliferation und Erhaltungsstoffwechsel. Auch bei geringen Zellzahlen sollten daher aktive Stoffumsätze (sowohl mikrobielle Proliferation als auch Erhaltungsstoffwechsel) und die Inkorporation von Substraten durch hydrogenotrophe Acetogene und Sulfatreduzierer zu erwarten sein. Durch die Zugabe von Substraten mit stabilen Isotopen kann deren Stoffumsatz und die Inkorporation identifiziert und differenziert werden. Die Hypothese wird in Laborversuchen an mikrobiellen Gemeinschaften aus der Sole des Kavernensumpfes getestet.

H3-I. Hat die Anwesenheit von Wasserstoff-Gas einen Einfluss auf die mikrobielle Inkorporation von Isotopen aus isotopisch angereichertem Karbonat (H^{13}CO_3) und Wasser ($^2\text{H}_2\text{O}$)?

H4: Wasserstoff-Gasspeicherung in Salzkavernen begünstigt das Wachstum von autotrophen Mikroorganismen. Die sich bildende Biomasse und entstehenden Metabolite begünstigen wiederum das Wachstum von heterotrophen Mikroorganismen. Durch Fermentation werden kurzkettige Fettsäuren gebildet, die Kohlenstoff- und Energiequellen für sulfatreduzierende Bakterien darstellen. Dies ermöglicht heterotrophe Sulfidogenese oder erleichtert autotrophe Sulfidogenese, die unter hypersalinen Bedingungen erschwert ist.

H4-I. Welchen Einfluss haben verschiedene Kohlenstoffquellen (CO_2 , Acetat, Laktat, Methanol) und verschiedene Salzgehalte (2,5 M, 3,4 M, 4,4 M) auf den Metabolismus einer Anreicherungskultur unter einer Wasserstoff-Gas Atmosphäre?

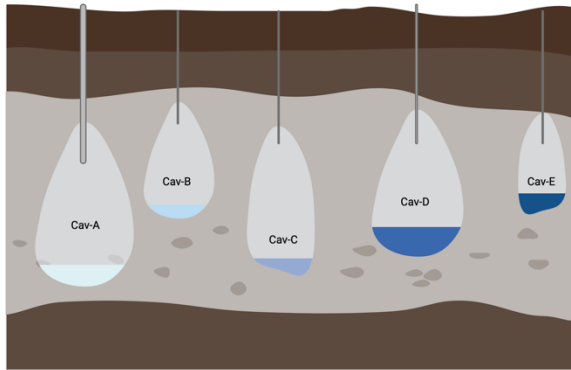
H4-II. Welche Mikroorganismen sind als Sulfatreduzierer und Homoacetogene Schlüsselmikroorganismen in der mikrobiellen Gemeinschaft?

2 Material and Methoden

Um die beschriebenen Hypothesen zu testen, wurden erstmalig fünf künstlich angelegte Salzkavernen beprobt, welche zum Zeitpunkt der Probenahme mit Erdgas beaufschlagt waren. Die experimentelle Umsetzung zur Klärung der vier Hypothesen und des mikrobiellen Risikopotentials sind in Abbildung 4 dargestellt und werden im Folgenden näher beschrieben. Für die initiale Charakterisierung von fünf Erdgaskavernen (H1) wurden Soleproben entnommen (Kapitel 2.1). Diese wurden für folgende Untersuchungen und Versuche verwendet: hydrochemische Untersuchungen (Kapitel 2.2), Bestimmung der mikrobiellen Zellzahl (Kapitel 2.3), und der mikrobiellen Diversität und ihres funktionellen Potentials (Kapitel 2.4). Eine abschließende Analyse des funktionellen Potentials der mikrobiellen Gemeinschaft der Soleproben war wegen der geringen DNA-Ausbeute nicht möglich, konnte aber für ausgewählte Anreicherungskulturen durchgeführt werden. Dafür wurden die verbliebenen Soleproben für kultivierungsbasierte Mikrokosmenversuche in Kooperation mit der Firma MicroPro GmbH aufgeteilt (Kapitel 2.5). Die Untersuchung von H₂ induzierter mikrobieller Proliferation und Sulfidogenese (H2-I) wurde in den Räumen der MicroPro GmbH durchgeführt (Kapitel 2.6). Die Soleproben wurden dafür mit H₂ Atmosphäre inkubiert und in regelmäßigen Abständen beprobt um die Zellzahl, die Sulfatkonzentration, den pH-Wert sowie den Wasserstoffverbrauch zu bestimmen. Nach Beendigung des Experiments wurde die Zellsuspension abfiltriert und für die Bestimmung der mikrobiellen Diversität und des funktionellen Potentials mittels Amplikon- und Metagenomsequenzierung genutzt. Zur Charakterisierung der mikrobiell induzierten Korrosion (H2-II) wurden Eisenprüfkörper eingesetzt, deren Oberflächenbeschaffenheit vor und nach der Inkubation in den Solemikrokosmen elektronenmikroskopisch analysiert wurde (Kapitel 2.7). Während der Inkubationszeit wurde mittels GC-IRMS die Wasserstoffisotopenfraktionierung als Indikator für mikrobielle Aktivität gemessen. Für die Investigation der mikrobiellen Aktivität in den Soleproben auf Einzelzellebene (H3) wurde zunächst die simultane Messung von Wasserstoff- und Kohlenstoffisotopen an einem nanoSIMS etabliert und schließlich für die Messung der mikrobiellen Inkorporation von Isotopentracern eingesetzt (Kapitel 2.8). Untersucht wurden die Soleproben von zwei Kavernen, als Positivkontrolle diente MP-32. Um Sulfidogenese bei verschiedenen Salzgehalten und mit variierenden Kohlenstoffquellen zu untersuchen (H4), wurde in Kooperation mit MicroPro GmbH eine moderat halophile Anreicherungskultur (SF-X)

in hypersalinem Medium inkubiert. Dabei wurde begleitend die Zellzahl, die Konzentration der Kohlenstoffquellen sowie des Sulfats und final die mikrobielle Diversität bestimmt (Kapitel-2.9).

H1 Charakterisierung des Kavernenmikrobioms

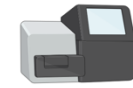


Probenahme



Analysen

1



Illumina Sequenzierung

1
2

2



Hochleistungsflüssig- & Gaschromatographie

3



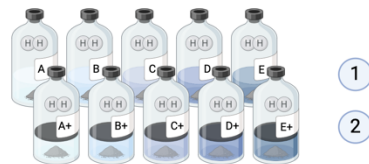
Isotopenverhältnis-Massenspektrometrie

4

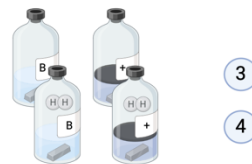


Sekundärelektronen-Mikroskopie

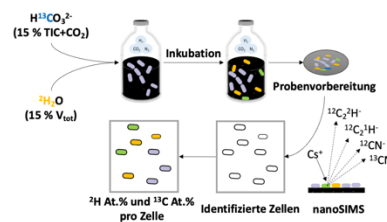
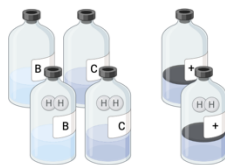
H2-I Einfluss von H₂ auf mikrobielles Wachstum & Sulfidogenese



H2-II Einfluss von H₂ auf mikrobiell induzierte Korrosion



H3 Einfluss von H₂ auf die mikrobielle Aktivität auf Einzelzellebene



H4 Auswirkungen von Salzgehalt und Kohlenstoffquellen



Abbildung 4 Methoden und experimenteller Aufbau

Um das mikrobielle Risikopotential zukünftiger H₂ UGS zu bestimmen, wurden erstmals 5 Salzkavernensümpfe beprobt und die Diversität ihrer mikrobiellen Gemeinschaft bestimmt (H1). Die Proben wurden außerdem dazu verwendet, um Zellen anzureichern sowie H₂-abhängige Stoffwechselprozesse (H2-I) und H₂-induzierte mikrobielle Korrosion (H2-II) zu untersuchen. Zur Detektion mikrobieller Aktivität auf Einzelzellebene in den Soleproben von Cav-B und Cav-C (H3), wurden stabile Isotope eingesetzt und deren Assimilation über eine eigens dafür etablierte Messmethode an einem nano-scale Sekundärionenmassenspektrometer entwickelt. Grundlegende Untersuchungen zur Auswirkung verschiedener Salzgehalte auf mikrobielle Stoffwechselprozesse (H4) wurden an Anreicherungskulturen untersucht.

2.1 Soleprobenahme am Kavernenfeld Mitteldeutschland

Fünf mit Erdgas beaufschlagte Kavernenspeicher (Cav-A, Cav-B, Cav-C, Cav-D, Cav-E) wurden im Zeitraum von August bis Oktober 2019 beprobt. Der Speicherstandort befindet sich in der Staßfurth Sequenz der Zechsteinformation in 0,5 bis 1,0 km Tiefe. Die Kavernenspeicher wurden in den 1970ern angelegt und seitdem mit Erdgas betrieben. Zwei Kavernenspeicher, Cav-A und Cav-B, wurden zu Beginn der Speicherung ebenfalls mit Stadtgas beaufschlagt. Dieses Gas wurde aus Kohle erzeugt und enthielt bis zu 50 % Wasserstoff. Seit den 1990ern wurden jedoch alle Kavernen auf importiertes Erdgas umgestellt. Sicherheitsaspekte machen es notwendig, dass der Flüssigkeitsstand und die Kavernendimensionen regelmäßig vermessen werden. Für die Hohlraumvermessungen werden Echolot-Sonden eingesetzt, für die Bestimmung des Kavernensumpfes Leitfähigkeitsmesser. Wie bereits eingangs erklärt, ist der Kavernensumpf das Formationswasser, welches nach der Solung nicht aus der Kaverne verdrängt werden kann. Die Tiefe des Kavernensumpfes war vor der Probenahme nicht abzusehen. Erst nach der Vor-Ort Messung der Kavernendimensionen und des Sumpfes war klar, dass seine Beprobung möglich ist. Entsprechend der Tiefe des Sumpfes wurde der Probenehmer mit 2-4 je 2 L Flaschen bestückt und über die Hochdruckschleuse abgeteuft (Abbildung 5 AB). Die Flaschen wurden untertage geöffnet und blieben für 60 Minuten untergetaucht, um eine ausreichende Befüllung zu gewährleisten. Mit geöffnetem Verschluss wurden die Flaschen bei einer Rate von 4 bar pro Minute in der Hochdruckschleuse dekomprimiert und schließlich ausgebaut (Abbildung 5 C). Die gewonnene Flüssigkeit wurde umgehend in Stickstoff-gespülte Flaschen überführt, die ohne Gasatmosphäre verschlossen wurden. Aus einem Aliquot wurde vor Ort der pH-Wert bestimmt. Weitere dienten für die Bestimmung und Analyse organischer und anorganischer Verbindungen (Tabelle 2). Entsprechend des thalassohalinen Ursprungs des Salzgesteins war davon auszugehen, dass Natrium, Chlorid und Sulfat-Ionen die Zusammensetzung dominieren, doch weitere Daten über andere Salze oder potenzielle mikrobielle Metabolite waren bisher unbeschrieben.



Abbildung 5 Probenahme am Kavernenfeld

Modifiziert nach Schwab et al. (2022), A: Kran mit der Hochdruckschleuse durch die der Probennehmer (B) abgeteuft wird. C: Zeigt den Probennehmer nach Ausbau aus der Sonde, die Schlammreste weisen auf eine Ölschicht zwischen Sole und Gasraum in der Kaverne hin. Die Probenahme wurde durch die Firma SOCON – Sonar Control Kavernenvermessung GmbH; Giessen, Germany ermöglicht.

2.2 Hydrochemische Analyse der Soleproben

Die hydrochemischen Parameter der Sole wurde von verschiedenen Analyzelaboren mittels genormter Methoden für die entsprechenden Nachweise der Substanzen bestimmt. Ausgewählt wurden die Summenparameter für gelösten organischen Kohlenstoff (DOC, engl. *dissolved organic carbon*), anorganischen Kohlenstoff (TIC, engl. *total inorganic carbon*), langkettige Kohlenwasserstoffe (KW-Index) und Alkohole (Methanol, Ethanol, Isopropanol), die auf Verunreinigungen durch Instandhaltungschemikalien hindeuten. Außerdem wurden die Konzentrationen kurzkettiger Fettsäuren bestimmt, die als Metabolite in Frage kommen (Formiat, Acetat, Laktat, Propionat, Butyrat, Valerat und Capronat), sowie die bioverfügbaren Formen von Stickstoff und Phosphor (Nitrit, Nitrat, Ammonium und Phosphat). Aufgrund des thalassohalinen Ursprungs der Salzkavernen, wurden die Konzentrationen von Chlorid, Natrium, Sulfat, Eisen und Kalium gemessen, um Aussagen über Salinität zu treffen.

Tabelle 2 Parameter und Nachweismethoden zur hydrochemischen Charakterisierung der Soleproben

Verwendete Analysemethoden für den quantitativen Nachweis verschiedenen Ionen, Kohlenwasserstoffe und kurzkettiger Fettsäuren. KW-Index = Kohlenwasserstoff-Index als Summenparameter für Mineralölbestandteile, DOC = engl. *dissolved organic carbon* (gelöster organischer Kohlenstoff), TIC = engl. *total inorganic carbon* (gesamter anorganischer Kohlenstoff), GC = Gaschromatographie, IC = Ionenchromatographie, ICP-MS = engl. *inductively coupled plasma mass spectrometry* (Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma).
Analyselabor: ¹Analytikum Umweltlabor GmbH (Merseburg), ²Open Grid Europe GmbH (Essen), ³Department für Analytik am Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung (Leipzig).

Parameter	Norm / Methode	Bestimmungsgrenze
KW-Index	DIN EN ISO 9377-2, 2001-07 (A), GC ¹	0,1 mg L ⁻¹
DOC	DIN EN 1484, 1997-08 (A), Direktmessung ¹	0,5 mg L ⁻¹
TIC	DIN EN 1484, 1997-08 (A) ¹	1 mg L ⁻¹
Methanol	DIN EN ISO 22155, 2016-07 (A), GC ¹	1 mg L ⁻¹
Ethanol	DIN EN ISO 22155, 2016-07 (A), GC ¹	1 mg L ⁻¹
Isopropanol	DIN EN ISO 22155, 2016-07 (A), GC ¹	0,01 mg L ⁻¹
Formiat	IC mod. nach DIN EN ISO 10304-1:2009-07 ²	0,002 mg L ⁻¹
Acetat	IC ²	0,002 mg L ⁻¹
Laktat	IC ²	0,001 mg L ⁻¹
Propionat	IC ²	0,001 mg L ⁻¹
n/i-Butyrat	IC ²	0,001 mg L ⁻¹
n-Valerat	IC ²	0,001 mg L ⁻¹
Capronat	IC ²	0,001 mg L ⁻¹
Chlorid	DIN EN ISO 10304-1, IC ³	0,03 mg L ⁻¹
Nitrit	DIN ISO 15923-1, Photometrie ³	0,02 mg L ⁻¹
Nitrat	DIN ISO 15923-1, Photometrie ³	0,5 mg L ⁻¹
Sulfat	DIN EN ISO 10304-1, IC ³	0,05 mg L ⁻¹
Ammonium	DIN ISO 15923-1, Photometrie ³	0,03 mg L ⁻¹
Phosphat	DIN ISO 15923-1, Photometrie ³	0,1 mg L ⁻¹
Eisen (total)	DIN EN ISO 17294-2; EPA Method 200.8, ICP-MS ³	0,3 mg L ⁻¹
Kalium	DIN EN ISO 17294-2; EPA Method 200.8, ICP-MS ³	0,04 mg L ⁻¹
Natrium	DIN EN ISO 17294-2; EPA Method 200.8, ICP-MS ³	0,04 mg L ⁻¹

2.3 Bestimmung der mikrobiellen Zellzahl der Soleproben

Die Zellzahl der in den Soleproben befindlichen Mikroorganismen, wurde durch Färbung der mikrobiellen DNA mit dem Fluoreszenzfarbstoff 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) durchgeführt (Kapuscinski 1995). Dafür wurden pro Kavernenprobe 10 mL Sole mit Paraformaldehyd (16 % in wässriger Lösung, EM Sciences, Hatfield, PA, USA) in einer finalen Konzentration von 2 % gemischt, um die vorhandenen Zellen zu fixieren. Die Suspension wurde nach Inkubation bei 4 °C für 16 h auf einem mit Gold-Palladium (80:20; Schichtdicke 30 nm) beschichteten Polyethersulfon-Membranfilter abfiltriert, welcher von einem Polykarbonatfilter unterstützt wurde, um die Unebenheiten im Vielfachfiltrationsgerät auszugleichen. PFA-Rückstände wurden mit 2 mL phosphatgepufferter Salzlösung (engl. *phosphate buffered saline*, PBS; 1x; pH 7,4; Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) ausgewaschen und anschließend die auf dem Filter zurückgehaltenen Zellen mit absolutierten Ethanol (mind. 99,8 %; ChemSolute®, TH Geyer GmbH & Co KG, Renningen) dehydriert. Dafür wurde der Ethanol-Anteil in PBS schrittweise auf 30, 50, 70, 80 und 90 % erhöht. Insgesamt drei Filterbereiche wurden ausgestanzt und für die Färbung mit 3,6 µM DAPI-Lösung (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) für 10 Minuten bei Raumtemperatur (RT) inkubiert, nachfolgend für eine Minute in sterilisiertem Reinstwasser und für 10 Sekunden in Ethanol (80 % v/v) gewaschen. Zuletzt wurden die Filterstücke in Eindeckmedium (4:1; CitiFluor™AF1, Science Services GmbH, München; Vectashield® LINARIS Biologische Produkte GmbH, Dossenheim) eingebettet und für mindestens 1,5 Stunden bei -20 °C inkubiert. Für eine statistische Auswertung wurden bei einer 100-fachen Vergrößerung 5 Sichtfelder pro ausgestanztem Filterbereich ausgezählt.

Tabelle 3 Materialien für die fluoreszenzbasierte Zellzahlbestimmung

Gegenstand	Hersteller
Membranfilter; Isopore™; 0,45 µm	Merck Millipore, Burlington, MA, USA
Isopore™; Polykarbonat; rund; 25 mm	
GTTP-Isopore™; 0,2 µm; Polykarbonat; rund; 25 mm; Au-Pd beschichtet	Merck Millipore, Burlington, MA, USA
Vielfachfiltrationsgerät 1225	Merck Millipore, Burlington, MA, USA
Fluoreszenz-Mikroskop	Imager.Z2, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena

2.4 Analyse der mikrobiellen Gemeinschaft

2.4.1 Extraktion mikrobieller DNA

Da davon ausgegangen wurde, dass nach der Probenahme am Kavernenfeld nur sehr wenig Probenmaterial mit geringem Zellzahlgehalt zu Verfügung stehen würde, wurden vorab verschiedene DNA-Extraktionsmethoden für extrem halophile Mikroorganismen evaluiert. Dafür wurden Proben aus Anreicherungskulturen verwendet, die von der Firma MicroPro GmbH zur Verfügung gestellt wurden. Je 2 mL Kulturflüssigkeit wurden auf Polyethersulfon-Membranfiltern mit einer Porengröße von 0,1 µm abfiltriert und die Extraktion mikrobieller DNA mit drei verschiedenen Methoden getestet. Die finale Methode wurde dann Anhand der größten DNA-Ausbeute und Reinheit, sowie der Alpha-Diversität, die mittels T-RFLP bestimmt wurde, ausgewählt. Für die Analyse mittels T-RFLP wurde ein Abschnitt des 16S rRNA-Gens durch PCR vervielfältigt und mit den Enzymen *HaeIII*, *RsaI* und *Bst-UI* geschnitten (Ziganshin et al. 2011). Die entstandenen Fragmente waren, bedingt durch die DNA-Sequenz, von unterschiedlicher Länge und gaben so einen Hinweis auf die Diversität in der Probe. Als Extraktionsmethoden wurden zwei Kits (DNeasy PowerWater Kit, DNeasy Tissue Kit Qiagen, nach Hersteller-Angaben) und eine modifizierte Phenol-Chloroform-Methode (Maher et al. 2001) verwendet. Die Phenol-Chloroform-Methode lieferte zufriedenstellende Ergebnisse und wurde daher für die DNA-Extraktion der Soleproben und weiterer Anreicherungskulturen verwendet. Die mikrobiellen Zellen wurden auf Polyethersulfon-Filtern mit einer Porengröße von 0,1 µm abfiltriert und chemisch lysiert. Dafür wurde der Filter in ein 25 mL Glasröhrchen mit Schraubdeckelverschluss überführt und mit Lyse-Puffer (150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 1 mM EDTA, 0,5 % SDS) überschichtet. Für die Herstellung des Lysepuffers wurde eine Tris-HCl-Lösung (10 mM) vorgelegt und die weiteren Bestandteile aus ihren Stammlösungen zugegeben. Der Lysepuffer wurde in 50 mL Aliquots aufgeteilt und autoklaviert. Pro Filter wurden 4 mL des Lysepuffers und 0,4 mg mL⁻¹ Proteinase K eingesetzt und für eine Stunde bei 55 °C in einem Hybridisierungsofen mit 6 rpm inkubiert. Im nächsten Schritt wurden auf dem Filter befindliche Reste durch Auf- und Abpipettieren des Lyse-Puffers abgespült und der Filter wurde mit einer sterilen Pinzette aus dem Röhrchen entfernt. Die Suspension wurde mit einem gleichen Volumen Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol gemischt, um die freigesetzte DNA von den anderen Zellbestandteilen zu trennen. Die Phasentrennung zwischen der DNA-enthaltenden, wässrigen Phase und der organischen Phase wurde durch

Zentrifugation bei Raumtemperatur (3.000 x g, 20 Minuten) unterstützt. Die wässrige Phase wurde in ein neues 25 mL Glasröhrchen überführt und Phenolreste wurden durch Mischen mit einem gleichen Volumen von Chloroform-Isoamylalkohol und erneuter Zentrifugation (3.000 x g, RT, 20 Minuten) entfernt. Die resultierende wässrige Phase wurde erneut in ein neues Glasröhrchen überführt, um die DNA mit Natriumacetat in einer finalen Konzentration von 0,3 M, 6 µL Glykogen, sowie dem 2,5-fachen Volumen an eiskaltem Ethanol auszufällen. Die Proben wurden dafür über Nacht bei -4 °C gelagert. Abschließend wurde die DNA durch Zentrifugation (10.000 x g, 4 °C, 60 Minuten) pelletiert, zwei Mal mit eiskaltem 70-prozentigem Ethanol gewaschen, für 15 Minuten in einem Exsikkator getrocknet und in 50 µL PCR-Wasser re-suspendiert.

Tabelle 4 Materialien, Puffer und Lösungen für die Extraktion genomischer DNA

Gegenstand	Hersteller
Polyethersulfon-Membranfilter; 0,1 µm; 0,47 mm; autoklaviert	Sartorius AG, Göttingen
Ganzglas-Vakuumfiltrationseinheit	Sartorius AG, Göttingen
Vakuumpumpe	KNF Laboport®, KNF DAC GmbH, Hamburg
Glasröhrchen; 25 mL	Corning Corex, USA
Hybridisierungsöfen	Mini MKII Hybaid, MWG Biotech
Kühlzentrifuge 5403	Eppendorf SE, Hamburg
Exsikkator	Aquastop, Van der Heijden, Dörentrup
TRIS-HCl; pH 8,0; 10 mM	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
NaCl; 1,5 M	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
EDTA; 10 mM	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
SDS; 5 % (w./vol.)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Proteinase K; 50 mg	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren
Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1)	Roti Aqua-P/C/I, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Chloroform-Isoamylalkohol (24:1)	ROTI C/I, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Ethanol abs.; min. 99,8 %	ChemSolute®, Th. Geyer GmbH & Co. KG, Renningen
Na-Acetat; 3 M; pH 5,5	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Glykogen (Auster); 20 mg mL ⁻¹	Serva, Heidelberg

2.4.2 DNA-Amplifikation und Amplikonsequenzierung

Für die taxonomische Zuordnung der mikrobiellen Gemeinschaft der Kavernenproben und Anreicherungskulturen wurden Teile der variablen Regionen V3 bis V5 des 16S rRNA-Gens amplifiziert und sequenziert. Für dessen Vervielfältigung mittels PCR wurden 10 ng der extrahierten genomischen DNA eingesetzt und verschiedene Primersets verwendet (Tabelle 5). Aufgrund des limitierten Soleprobenvolumens und der daraus resultierenden geringen Menge extrahierter DNA wurde ein universelles Primerpaar ausgewählt, der sich bereits in dem Earth Microbiome Project bewährt hatte (Caporaso et al. 2011, Genderjahn et al. 2018). Dieses Primerpaar wurde eingesetzt um die mikrobielle Diversität in den Kavernen, die auch Ausgangsmikrobiome der Experimente waren, zu untersuchen. Ein Reaktionsansatz bestand aus 12,5 µL MyTaq™ Mix (2x, Bioline, Heidelberg), 1 µL bovinem Serumalbumin (2 mg mL⁻¹), sowie je 1 µL des entsprechenden Primers (0,2 µM). Der Reaktionsansatz umfasste 25 µL und wurde nach Zugabe der genomischen DNA mit PCR-H₂O aufgefüllt. Das Temperaturprofil setzte sich aus einer initialen Denaturierung für 1 Minute bei 96 °C, gefolgt von 30 Zyklen Denaturierung, Primeranlagerung und Strangverlängerung für je 30 Sekunden bei 95, 50 und 72 °C, sowie einer abschließenden Strangverlängerung bei 72 °C für 5 Minuten zusammen. Bei den Versuchen mit geringerem und variierendem Salzgehalt (H4) erlaubten die hohen Zellzahlen das Verwenden von zwei Primerpaaren, welche spezifisch für die Amplifikation von sowohl bakterieller als auch archaeeller 16S-rRNA Gensequenzen sind. Das Bakterien-spezifische Primerpaar (Klindworth et al. 2013) wurde im Reaktionsansatz auf 0,2 µM eingestellt. Ausgenommen der Primeranlagerung bei 55 °C, war das Temperaturprofil identisch zu dem des universellen Primerpaares. Für die Amplifikation und Sequenzierung des archaeellen 16S rRNA-Gens wurde die DNA in zwei Stufen vervielfältigt. Zunächst wurde ein Archaeen-spezifisches Primerpaar eingesetzt, um Fragmente mit einer Länge von 660 bp zu erzeugen (Gantner et al. 2011). Dieses diente dann als Ausgangsmaterial für eine erneute Amplifikation mit einem universellen Primerpaar, welches innerhalb des Templates anlagerte (Sundberg et al. 2013). In beiden Fällen setzte sich das Temperaturprofil aus einer initialen Denaturierung bei 96 °C für 1 Minute und 20 Zyklen Denaturierung, Primeranlagerung und Strangverlängerung für 15, 30 und 90 Sekunden bei 96, 50 und 70°C zusammen. Die Qualität und korrekte Länge der Amplikons wurde mittels Gelelektrophorese überprüft.

Tabelle 5 Verwendete Primerpaare für die Amplifikation spezifischer Sequenzabschnitte des 16S rRNA Gens

Name	Sequenz	Länge	T ¹	Target	Referenz
515F	5'-GTGCCAGCMGCCGCGGTAA-3'	291	50 °C	V4	Caporaso et al. (2011)
806R	5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3'	bp			
340F	5'-CCCTAYGGGGYGCASCAG-3'	660	50 °C	V3V5	Gantner et al. (2011)
1000R	5'-GGCCATGCACYWCYTCTC-3'	bp			
341F	5'-CCTAYGGGRBGCASCAG-3'	465	50 °C	V3V4	Sundberg et al. (2013)
806R	5'-GGACTACNNGGGTATCTAAT-3'	bp			
341F	5'-CCTACGGGNGGCWGCAG-3'	444	55 °C	V3V4	Klindworth et al. (2013)
785R	5'-GACTACHVGGGTATCTAATCC-3'	bp			

¹ Primerspezifische Anlagerungstemperatur

In den darauffolgenden Schritten wurden die DNA Amplikons gemäß Herstellerangaben für die Sequenzierung vorbereitet („16S Metagenomic Sequencing Library Preparation“ 15044223 B, Illumina, 2013). Zunächst wurden die Amplikons von PCR-Chemikalien gereinigt. Dafür wurde das gesamte PCR-Reaktionsgemisch nach Amplifikation (25 µL) mit 52 µL einer Suspension aus magnetischen Mikrokügelchen gemischt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, um die DNA Amplikons über ihre negative Ladung an die aktive Oberfläche der Magnetkügelchen zu binden. Durch einen Magnetständer wurden die Kügelchen dann an der Wand des Reaktionsgefäßes fixiert und der Überstand konnte verworfen werden. Es folgten zwei Waschschrte mit 200 µL Ethanol (80 %, frisch hergestellt aus absolutiertem Ethanol und sterilem Reinstwasser, bei -20 °C gekühlt). Daraufhin wurden die Reaktionsgefäße aus dem Magnetständer genommen und die Kügelchen in 52,5 µL Tris-Puffer re-suspendiert. Während der 2-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur löste sich die DNA durch veränderte Bindungsbedingungen von den Magnetkügelchen. Die Reaktionsgefäße wurden dann wieder auf den Magnetständer gestellt und an der Wand des Reaktionsgefäßes fixiert. So konnten 50 µL des Überstandes mit den DNA-Amplikons entnommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt werden. Aus diesem Überstand wurden 5 µL entnommen, um damit die Index-PCR durchzuführen. Für jede Probe wurde eine unterschiedliche Primerkombination verwendet, um so alle Amplikons aus einer Probe mit einer identischen Erkennungssequenz zu versehen. Der Reaktionsmix setzte sich aus je 5 µL der beiden Primer, 5 µL der gereinigten Amplikons

sowie 25 µL MyTaq™ HS Mix und 10 µL PCR-H₂O zusammen. Die Amplikons wurden nach einer initialen Denaturierung bei 95 °C für 3 Minuten, mit 10 Zyklen Denaturierung, Index-Primeranlagerung und Verlängerung bei 95 °C, 55 °C und 72 °C für jeweils 30 Sekunden, sowie einer finalen Elongation bei 72 °C für 7 Minuten mit dem entsprechenden Index versehen. Die entstandenen Amplikons wurden erneut über magnetische Mikrokügelchen nach dem gleichen Protokoll aufgereinigt und die Konzentration der DNA wurde, basierend auf Interaktion mit einem Fluoreszenz-Farbstoff, nach Herstellerangaben an einem Fluorometer gemessen. Alle Proben wurden auf eine DNA-Konzentration von 4 nM eingestellt und je 5 µL pro Probe wurden vereinigt, mit 0,2 M Natronlauge denaturiert, auf eine finale Konzentration von 14 pM verdünnt und mit 15 % eines internen Standards sequenziert. Für die Sequenzierung wurde die v3 Reaktionschemie von Illumina mittels reversibler Terminatoren ausgewählt (Bentley et al. 2008).

Tabelle 6 Geräte und Kits zur Amplifikation und Sequenzierung von Nukleinsäuren

Gegenstand	Hersteller
PCR-H ₂ O	Qiagen GmbH, Hilden
MyTaq™ HS Mix; 2x	Bioline Meridian Bioscience, Heidelberg
Fluorometer und Kit	Qubit™ 3.0 Fluorometer und Qubit™ DNA High Sensitivity Kit, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Magnetische Mikrokugeln	AMPure XP A63881, Beckmann Coulter, Pasadena, CA, USA
Kit für die Herstellung der Bibliothek	Nextera XT DNA Library Preparation Kit, Illumina, San Diego, CA, USA
Sequenzierchemie	MiSeq™ Reagent Kit V3 (600 Zyklen), Illumina, San Diego, CA, USA
Thermocycler	C100 Touch™, Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA
Sequenziergerät	MiSeq™, Illumina, San Diego, CA, USA

Es wurden je 300 Basenpaare pro Vorwärts- und Rückwärtsstrang sequenziert. Dazu wurde die einzelsträngige DNA auf die Durchflusszelle aufgetragen, über eine komplementäre Bindung der Adaptersequenz mit der Durchflusszelle immobilisiert und an dieser Stelle über Brücken-Amplifikation vervielfältigt. Dies erlaubte die eigentliche Bestimmung der

Basenabfolge des Vorwärtsstranges im nächsten Schritt. Nach Anlagerung eines Primers wurden komplementäre DNA-Basen mittels Bst DNA-Polymerase eingebaut. Diese waren mit einem basenspezifischen Fluoreszenzfarbstoff versehen, welcher gleichzeitig die weitere Strangverlängerung verhinderte. Pro Durchlauf konnte also nur eine Base eingebaut werden, die nach dem Durchlauf durch die Emission ihres spezifischen Fluorophors und die Verstärkung dieses Signals durch die hohe Anzahl identischer DNA-Kopien in großer Nähe identifiziert werden konnte. Es folgten 299 weitere Durchläufe, bevor der Vorwärtstrang durch Veränderung der Bindungschemie entfernt und dieser Ablauf für den Rückwärtsstrang wiederholt wurde. Anschließend wurden alle Vorwärts- und Rückwärtsstrangsequenzen über die Indexsequenz ihrer ursprünglichen Probe zugeordnet (engl. *demultiplexed*) und mit einer Qualitätsinformation versehen.

2.4.3 Bioinformatische Analyse der mikrobiellen Diversität

Die Auswertung der erzeugten Rohdaten erfolgte mit der Software qiime2, Version 2021.2 (Bolyen et al. 2019). Zuerst wurden die Primer anhand ihrer Sequenz mit cutadapt, Version 1.15 (Martin 2011) erkannt und entfernt. Dann wurde die Qualität der erhaltenen Sequenzen mit fastqc und mulitqc (Versionen 0.11.5 and 1.10.1) bestimmt. Die Qualität der Sequenzierung nahm im Vorwärtsstrang nach 270 und im Rückwärtsstrang nach 240 Basen ab. Im nächsten Schritt wurden die Sequenzen auf diese Länge gekürzt und aus komplementären Vorwärts- und Rückwärtssträngen wurden Amplikon-Sequenz-Varianten (ASVs) mit dada2, Version 1.18.0 (Callahan et al. 2016) erstellt. Die taxonomische Zuordnung dieser ASVs erfolgte durch Abgleich mit dem jüngsten rRNA-Archiv (138.1) der ARB-SILVA Datenbank (Quast et al. 2012; Yilmaz et al. 2013) anhand eines, auf diese V3 - V4 Region trainierten, *machine learning* Algorithmus (Bokulich et al. 2018). Die Ergebnisse wurden in eine Biom-Datei überführt um die relative Abundanz der taxonomischen Gruppen in R Studio (Version 4.1.0) mit den Paketen phyloseq und microbiome (McMurdie und Holmes 2013; Shetty und Lahti 2019) zu visualisieren. Dabei wurden alle ASVs mit einer relativen Abundanz >3 % auf Familienebene zusammengefasst und in einem Balkendiagramm visualisiert. Das zentrale Solemikrobiom der fünf Kavernen wurde bestimmt, indem nach den vordringlichsten Spezies gefiltert wurde, die bei einer Detektionsgrenze > 1 %, in mehr als der Hälfte der Proben auftraten. Die Unähnlichkeit der mikrobiellen Zusammensetzung in den Soleproben wurde außerdem über den Bray-Curtis-Index (Bray und Curtis, 1957) bestimmt, die

resultierende Distanzmatrix wurde mittels Hauptkoordinatenanalyse (PCoA) ausgewertet. Für beide Methoden wurde das R Paket *microbiome* verwendet (Shetty und Lahti 2019).

2.4.4 Bestimmung des funktionellen Potentials mittels Metagenomsequenzierung

Für die Bestimmung des mikrobiellen Metagenoms wurden Extrakte genomischer DNA an Genewiz GmbH Leipzig übermittelt. Die Sequenzierung erfolgte dort auf einem Illumina NovaSeq mit einer Read-Länge von 150 Basenpaaren. Es wurden 10 M Sequenzpaare erzeugt, die mittels metaWrap (Uritskiy et al. 2018) ausgewertet wurden. Im Detail wurden die Adaptersequenzen mit trim-galore (Krüger 2012) entfernt und die Qualität der Reads wurde mit fastqc und quast bestimmt (Andrews 2010; Gurevich et al. 2013). Anschließend wurden mit metaspades (Nurk et al. 2017) aus den gereinigten Sequenzen größere zusammengehörende Sequenzen (engl. contigs), mit einer Mindestlänge von 1000 Basenpaaren ermittelt. Diese wurden dann mit den Binning-Algorithmen (engl. *binner*) metabat2 (Kang et al. 2019), maxbin2 (Wu et al. 2016) und concoct (Alneberg et al. 2014) in verschiedene Gruppen (engl. *bins*) eingeteilt. Im Falle von maxbin2, wurde die Auswahl anhand von 40 Markergenen für Bakterien und Archaeen getroffen. In einem letzten Schritt wurden die Ergebnisse aller Binner mit den Ausgangssequenzen verglichen und verfeinert (Song und Thomas 2017). Dabei wurden nur Bins mit einer Vollständigkeit von 80 % und einer maximalen Kontaminationsrate von 5 % erlaubt, die mit Checkm anhand des Vorhandenseins von universellen Genen in einzelnen phylogenetischen Linien bestimmt wurden (Parks et al. 2014). Die Taxonomie dieser metagenom-assemblierten Genome (MAGs) wurde mittels der GT-Datenbank, GTDB-k (Chaumeil et al. 2019) bestimmt. Die phylogenetische Zuordnung der erhaltenen MAGs wurde durch eine multiple Sequenzalignment (MSA) von 49 zentralen Genen mittels Fasttree2 ermittelt (Price et al. 2010). Die Annotation erfolgte über DRAM (Shaffer et al. 2020), so wurden die im Genom codierten Proteinsequenzen extrahiert. Diese dienten dann zur Bestimmung des isoelektrischen Punktes. Dafür wurde eine von ExPASy bereitgestellte R-Funktion (compute pI/MW) genutzt (Gasteiger et al. 2005; Bjellqvist et al. 1993; Bjellqvist et al. 1994).

2.5 Anaerobe Kultivierung und Monitoring des mikrobiellen Wachstums

Für die Anreicherung, Routinekultivierung und Inkubationsversuche, wurden verschiedene Medien und Techniken verwendet. In allen Fällen wurde unter Ausschluss von Sauerstoff gearbeitet, um das Wachstum von strikt anaeroben Mikroorganismen zu erlauben. Dies beinhaltet die anaerobe Herstellung von Medien und Lösungen sowie das anaerobe Transferieren von Zellsuspensionen. Anoxische Lösungen wurden entweder aerob hergestellt, durch begasen mit N_2 -Gas anaerobisiert und dann autoklaviert oder aerob hergestellt, sterilfiltriert und dann unter sterilen Bedingungen begast. Zur Aufbewahrung wurden sterile Serumflaschen verwendet, welche aseptisch mit Butylstopfen versiegelt wurden. Für eine aseptische und anoxische Entnahme wurde die Oberfläche des Stopfens abgeflammt und eine Spritze ebenfalls dreimal mit sterilem N_2 -Gas gespült, bevor das entsprechende Volumen der Lösung oder Zellsuspension mit N_2 -Gas ersetzt und dann entnommen wurde.

2.5.1 *Desulfovermiculus halophilus* DSM 18834

D. halophilus DSM 18834 wurde von der Deutschen Stammsammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig) bezogen. Die Kultivierungsmedien wurden nach der von Widdel beschriebenen Technik hergestellt (Widdel 1980).

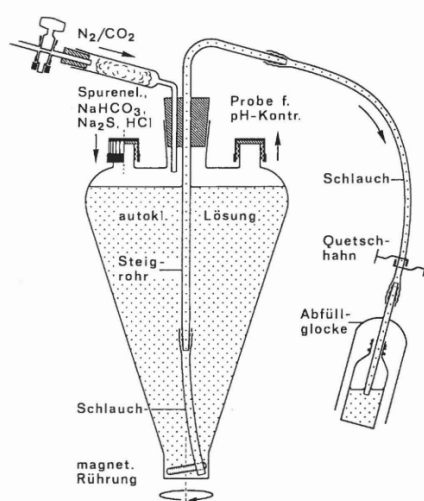


Abbildung 6 Herstellung anaerober Medien nach Widdel (1980)

In einen Glaskolben wird heißes Medium eingefüllt. Anschließend kühlt dieser unter Begasung in sauerstofffreier Atmosphäre (N_2) ab. Der Aufbau ermöglicht im Anschluss die anoxische Zugabe von hitzeempfindlichen Zusätzen sowie das anoxische Abfüllen in Kulturflaschen.

Dafür wurden die hitzebeständigen Chemikalien des Mediums nacheinander in Reinstwasser gelöst (Halo-Medium, Tabelle 7), auf ein Volumen von 1935 mL aufgefüllt und mit einem Magnetrührer für 25 Minuten bei 125 °C autoklaviert. Noch heiß, wurde das Medium inklusive Magnetrührer in einen nach unten spitzzulaufenden, sterilen Kolben (Abbildung 6) überführt und mit dem zugehörigen Kopfteil verschlossen (Widdel 1980). Der Gasraum wurde dabei kontinuierlich mit N₂-Gas gespült, welches durch einen Sterilfilter in den Kolben geleitet wurde. Nachdem das Medium Raumtemperatur erreicht hatte, wurden die hitzeempfindlichen Bestandteile aus anoxischen Stammlösungen zugegeben. Die Medienzusätze sind in Tabelle 8 gelistet und wurden in dieser Reihenfolge zugegeben. Bevor die Zugabe der Bikarbonat-Lösung erfolgte, wurde die Gaszusammensetzung im Kopfraum auf 20 % CO₂ und 80 % N₂ eingestellt und eine Spatelspitze Natriumdithionit zugegeben. Nach Zugabe der Sulfidlösung wurde der pH-Wert überprüft und gegebenenfalls mit H₂SO₄ (1M) oder H₂CO₃ (1 M) auf 7,2 eingestellt. Die Verschlusskappen wurden dann vollständig zugedreht, so dass das Medium durch den sich aufbauenden Überdruck über einen Schlauch vom Grund des Gefäßes randvoll in sterilisierte Vorratsflaschen abgefüllt werden konnte.

Die Kultivierung und Anreicherung erfolgte in 120 mL Serumflaschen. Dafür wurden 45 bis 50 mL des Mediums aseptisch mit sterilen Vollpipetten aus den Vorratsflaschen entnommen und in Serumflaschen überführt. Der Gasraum wurde mit einem Gemisch aus 20 % CO₂ und 80 % N₂ für eine Stunde gespült, bevor die Serumflasche mit einem sterilen Butyl-Stopfen verschlossen und mit einer Aluminium-Kappe versiegelt wurde. Für die Routinekultivierung von *D. halophilus* wurden 5 mL der Vorkultur verwendet. Als Energiequelle wurde H₂-Gas über einen Membranfilter (Porengröße 0,22 µm) und eine Kanüle in die Flüssigphase der Kulturflasche bis zu 1 bar Überdruck eingeleitet. Die Kultivierung erfolgte ruhend bei 30 °C.

2.5.2 Anreicherungskultur MP-32

Die Anreicherungskultur MP-32 entstammt einer mikrobiologischen Routineanalyse die 2013 an einem europäischen Kavernenspeicher von MicroPro GmbH genommen wurde. Die Kultivierung erfolgte in einem mineralischen Medium nach Appling, welches von MicroPro modifiziert wurde (Medium-1, Tabelle 7, 8). Nach dem Autoklavieren wurde das Basismedium in N₂-Gas Atmosphäre abgekühlt, danach wurden die in Tabelle 8 gelisteten Zusätze unter kontinuierlicher Begasung mit N₂ anoxisch zugegeben und der pH-Wert mit NaOH auf 7,5

eingestellt. Das Medium wurde anaerob und aseptisch auf 120 mL Serumflaschen verteilt und mit 20 % CO₂ und 80 % N₂ ruhend bei 30 °C inkubiert. Als Elektronendonator diente H₂.

Tabelle 7 Zusammensetzung der verwendeten anaeroben Medien

Medienzusatz	Zusammensetzung	Menge g / L⁻¹	Konzentration / M
Halo-Medium	NaCl	100	1,711 M
	CaCl ₂ x 2 H ₂ O	1	0,007 M
	MgCl ₂ x 6 H ₂ O	3	0,015 M
	KCl	0,5	0,007 M
	Na ₂ SO ₄	2,8	0,020 M
	Spurenelement Lösung	1 mL L ⁻¹	-
	Vitamin Lösung	1 mL L ⁻¹	-
	Se-Wo-Lösung	1 mL L ⁻¹	-
	Ammonium-Lösung	1 mL L ⁻¹	0.004 M
	Phosphat-Lösung	1 mL L ⁻¹	0.001 M
	Bicarbonat-Lösung	30 mL L ⁻¹	0.001 M
	Sulfid-Lösung	1 mL L ⁻¹	0.001 M
	Natriumdithionit	10 mg	5 x 10 ⁻⁵ M
Medium-1	K ₂ HPO ₄	0.5	0,004 M
	MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0.2	0,001 M
	Na ₂ SO ₃	0.6	0,005 M
	CaCl ₂ wasserfrei	0.01	0,0001 M
	NaCl	300	5,133 M
	(NH ₄) ₂ SO ₄	0.5	0,004 M
	NaSO ₄	0.5	0,004 M
	Spurenelement Lösung	1 mL L ⁻¹	-
	Vitamin Lösung	1 mL L ⁻¹	-
	Se-Wo-Lösung	1 mL L ⁻¹	-
	(NH ₄) ₂ Fe(SO ₄) ₂	10 mL L ⁻¹	0,005 M
	Bicarbonat-Lösung	30 mL L ⁻¹	0.001 M
	Medium-2	NaCl	100 - 260
K ₂ HPO ₄		0,5	0,007 M
MgCl ₂ x 6 H ₂ O		0,43	0,015 M
CaCl ₂		0,01	0,007 M
(NH ₄) ₂ Cl		0,5	0,007 M
Na ₂ SO ₄		2,8	0,020 M
Spurenelement Lösung		1 mL L ⁻¹	-
Vitamin Lösung		1 mL L ⁻¹	-
Se-Wo-Lösung		1 mL L ⁻¹	-
Bicarbonat-Lösung		30 mL L ⁻¹	0.001
Natriumdithionit-Lösung		10 mL L ⁻¹	1x10 ⁻⁵
C-Quelle			0,008-0,010 M ¹

¹ Acetat, Methanol: 10 mM, Laktat: 8 mM

2.5.3 Anreicherungskultur SF-X

Die artifizielle Mischkultur SF-X wurde aus Proben zusammengesetzt, die ursprünglich zwischen 2007 und 2013 im Rahmen mikrobiologischer Routineanalysen in verschiedenen europäischen UGS und Kohlenwasserstofflagern in Salzkavernen und salinen Aquiferen von MicroPro GmbH genommen wurden. Mikrobielle Gemeinschaften aus diesen Proben wurden mit verschiedenen Elektronendonoren und -akzeptoren angereichert und bei verschiedenen Salzgehalten zusammengeführt und kultiviert. Relevante, d.h. extrem-halophile sulfatreduzierende Kulturen, wurden ausgewählt und anaerob bei drei Salzgehalten kultiviert (Medium-2 mit 2,5; 3,4 und 4,4 M NaCl, Tabelle 7), bevor Untergruppen mit verschiedenen C-Quellen (Acetat, Laktat, Methanol, ohne Zusatz) für Folgeexperimente hergestellt wurden.

Tabelle 8 Verwendete Medienzusätze und deren Zusammensetzung

Medienzusatz	Zusammensetzung	Menge / L⁻¹	Konzentration
Ammonium-Lösung	NH ₄ Cl	200,0 g	3.7 M
Phosphat-Lösung	KH ₂ PO ₄	150,0 g	1.1 M
Spurenelement-Lösung	HCl (25 %; 7,7 M)	12,5 mL	100 mM
	FeSO ₄ x 7H ₂ O	2100,0 mg	7,5 mM
	CoCl ₂ x 6H ₂ O	190,0 mg	0,8 mM
	ZnSO ₄ x 7H ₂ O	144,0 mg	0,5 mM
	MnCl ₂ x 4H ₂ O	100,0 mg	0,5 mM
	NaMoO ₄ x 2H ₂ O	36,0 mg	0,15 mM
	H ₃ BO ₃	30,0 mg	0,5 mM
	NiCl ₂ x 6H ₂ O	24,0 mg	0,1 mM
	CuCl ₂ x 2H ₂ O	2,0 mg	0,01 mM
Vitamin-Lösung	Pyridoxynhydrochlorid	15,0 mg	0,89 mM
	Nicotinsäure	10,0 mg	0,81 mM
	Ca-D(+) Pantothenat	5,0 mg	0,21 mM
	4-Aminobenzoesäure	4,0 mg	0,30 mM
	D(+)-Biotin	1,0 mg	0,04 mM
	Phosphatpuffer (pH 7,1)	ad 100 mL	
Selen-Wolfram-Lösung	NaOH	400 mg	10 mM
	Na ₂ SeO ₃ x 5H ₂ O	6,0 mg	0,02 mM
	Na ₂ WO ₄ x 2H ₂ O	8,0 mg	0,02 mM
(NH ₄) ₂ Fe(SO ₄) ₂	(NH ₄) ₂ Fe(SO ₄) ₂	100 g	352 mM
Bikarbonat-Lösung	NaHCO ₃	84 g	1 M
Sulfid-Lösung	Na ₂ S x 9H ₂ O	24 g	1 M

2.5.4 Bestimmung des mikrobiellen Wachstums

Mikrobielles Wachstum sowie verschiedene Stoffwechselprodukte wurden in den verwendeten anaeroben Kulturen kontinuierlich durch sterile Probenentnahme gemessen. Mikrobielles Wachstum wurde mittels Thoma-Zählkammer quantifiziert. Die Sulfatkonzentration als Indikator für mikrobielle Sulfatreduktion, sowie der Verbrauch oder die Produktion von Acetat und Laktat wurden an einem Ionenchromatographen mit Leitfähigkeitsdetektor gemessen (Schwab et al. 2023). Das Volumen der Kulturflüssigkeit, welches für die Analyse entnommen wurde, wurde nicht wieder aufgefüllt. Gasproben zur Bestimmung der Konzentration von H₂, CO₂ und CH₄ im Gasraum der Serumflaschen wurde ebenfalls kontinuierlich entnommen und anschließend chromatographisch mit einem Wärmeleitfähigkeitsdetektor bestimmt (Tabelle 9). Für die Analyse der Gaszusammensetzung wurden 0,1-1 mL Probe mit gasdichten Spritzen aseptisch aus dem Gasraum der Kulturflaschen entnommen, in einem Gaschromatographen gemessen und mit einem Gemisch der ursprünglichen Gaszusammensetzung ersetzt.

Tabelle 9 Geräte zur Quantifizierung mikrobieller Wachstumsparameter und Stoffwechselprodukte

Gegenstand	Hersteller
Gaschromatograph mit Wärmeleitfähigkeitsdetektor	Gach 21.3, VEB Chromatron, Berlin. CO₂ Messung: Säule: Al ₂ O ₃ -Säule, 3m (VEB Leuna-Werke); Beschichtung: 20 % Oxidipropionitril; Flussrate: 0,8 mL s ⁻¹ ; Trägergas: H ₂ . CH₄ und H₂ Messung: Säule: Molsieve 5A, 3 m, 60/80 Mesh (Ziemer Chromatographie) Flussrate: 0,8 mL s ⁻¹ ; Trägergas: Ar.
Ionenchromatographen mit Leitfähigkeitsdetektor	ICS-1100 Dionex, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA. Sulfatmessung: Säule: Dionex IonPac™ AS23, 4 x 250 mm; Flussrate: 1 mL min ⁻¹ ; Injektionsvolumen: 25 µL; Elution: 4,5 mM / 0,8 mM Na ₂ CO ₃ . Acetat- und Laktatmessung: Säule: Dionex IonPac™ AS1, 9 x 250 mm, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA. Flussrate: 1 mL min ⁻¹ ; Injektionsvolumen: 25 µL; Elution: 0,5 mM Heptafluorbuttersäure
Phasenkontrastmikroskop	Zeiss AxioScope A.1, Jena, Deutschland

2.6 Einfluss von H₂ Gas auf mikrobielles Wachstum und Sulfidogenese

Um den Einfluss von Wasserstoff-Gas auf die Proliferation und den Metabolismus der mikrobiellen Gemeinschaft in den Soleproben der fünf Kavernen zu untersuchen, wurden fünf Versuchsreihen (VR) angesetzt. Dafür wurden unter anaeroben Bedingungen je 10 g Steinsalz (Körnung 0,2 bis 0,5 cm) in 120 mL Serumflaschen abgewogen bevor 60 mL der jeweiligen Soleprobe der Kavernen A, B, C, D und E zugegeben wurden (VR 1-5, Tabelle 10). Die Serumflaschen wurden mit Butylstopfen verschlossen und mit Aluminiumkappen versiegelt. Als Positivkontrolle wurden die Versuche ebenfalls mit der Anreicherungskultur MP-32 durchgeführt. Diese wurde aus der Stammsammlung von MicroPro GmbH ausgewählt, da sie aus einer Kavernensoleprobe angereichert wurde und Wachstum bei 32 % NaCl (5,5 M) nachgewiesen wurde. So konnte ausgeschlossen werden, dass die NaCl-Konzentration der Soleproben limitierender Faktor in den Mikrokosmenversuchen ist.

Tabelle 10 Zusammensetzung der Versuchsreihen für die Bestimmung von H₂-induzierten mikrobiellen Wachstums und Sulfidogenese

Versuchsreihe	Medium	Kohlenstoffquelle	Substrat
VR1	Soleprobe Cav-A		
VR2	Soleprobe Cav-B		
VR3	Soleprobe Cav-C	Steinsalz (f)	H ₂ (g, 2 bar)
VR4	Soleprobe Cav-D		
VR5	Soleprobe Cav-E		
KR1	Soleprobe Cav-A + MP32		
KR2	Soleprobe Cav-B + MP32		
KR3	Soleprobe Cav-C + MP32	Steinsalz (f)	H ₂ (g, 2 bar)
KR4	Soleprobe Cav-D + MP32		
KR5	Soleprobe Cav-E + MP32		
KR6	Me-1 + MP32		

Dafür wurden 2 x 2 mL der Anreicherungskultur unter anaeroben Bedingungen abzentrifugiert, in 0,5 mL des Kultivierungsflüssigkeit re-suspendiert und mit einer Spritze aseptisch in identisch vorbereitete Versuchsansätze injiziert (KR 1-5, Tabelle 10). Um die Auswirkungen der Kultivierung von MP-32 in den Soleproben besser evaluieren zu können,

wurde ein weiterer Ansatz mit definiertem Medium (Me-1, Tabelle 7) durchgeführt (KR 6, Tabelle 10). Der Gasraum aller Versuchsansätze wurde dann gegen sterilfiltriertes H₂-Gas ausgetauscht und auf 2 bar eingestellt. Die Anreicherungskultur MP32 wurde aus der Stammsammlung von MicroPro GmbH ausgewählt, da in Vorversuchen eine hydrogenotrophe Sulfatreduktion bei 5,5 M NaCl im Medium nachgewiesen wurde. Der Versuch wurde gemeinsam geplant und aufgrund der begrenzten Probenvolumina nur in den Laboren von MicroPro GmbH durchgeführt, beprobt und gemessen. Dort wurde die Zellzahl, die Sulfat- und H₂-Konzentration bestimmt (2.5.3). Im Anschluss wurden die Versuchsansätze am Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung für molekularbiologische Analysen nach einer Inkubationszeit von 182 Tagen beendet. Insgesamt wurden 5 mL Zellsuspension abfiltriert, in flüssigem Stickstoff gefroren und bei -80 °C gelagert. Die DNA-Extraktion und Amplikonsequenzierung wurden mit den in Abschnitten 2.4.1 bis 2.4.4 beschriebenen Protokollen und dem in universellen Primerpaar (Caporaso et al. 2011) durchgeführt.

2.7 Einfluss von H₂ auf mikrobiell induzierte Korrosion

Für die Bestimmung des Korrosionspotentials halophiler Mikroorganismen wurden Eisenprüfkörper in anaeroben Kultivierungsansätzen mit-inkubiert. Die Eisenprüfkörper wurden von der UFZ-Werkstatt aus einem, speziell für die Wasserstofftechnologie verbesserten Eisenwerkstoff ausgeschnitten (10 mm x 1 mm x 50 mm) und in zwei Schritten wie folgt für die Versuche vorbereitet. Mit einem Schleifpapier wurden alle Seiten mechanisch gereinigt, bis die Oberfläche optisch frei von Rost und Unebenheiten war. Im nächsten Schritt wurden die Prüfkörper drei Mal für 3 Minuten in Salpetersäure (10 % v/vol.) eingelegt, dann in Aceton (99,8 % v/vol.) überführt und für 5 Minuten im Ultraschallbad inkubiert. Abbildung 7 zeigt den Eisenprüfkörper nach der Reinigung, der in einer 120 mL Serumflaschen autoklaviert wurde.

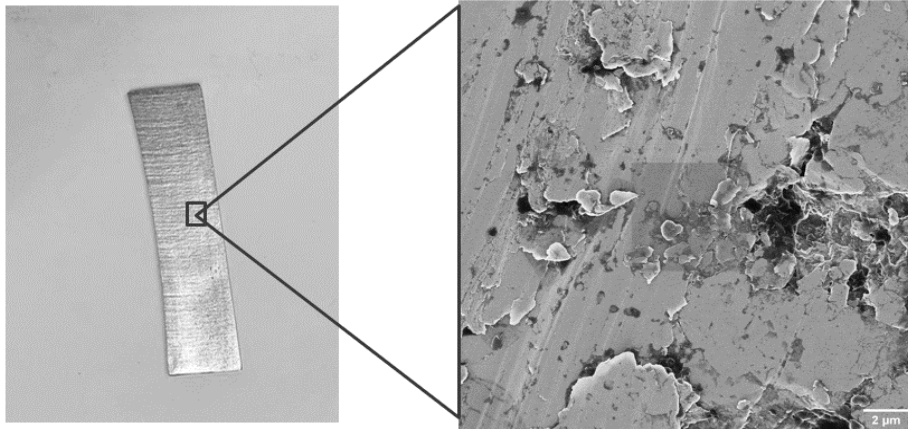


Abbildung 7 Eisenprüfkörper zur mikroskopischen Untersuchung mikrobiell induzierter Korrosion

Exemplarisches Foto eines verwendeten Eisenprüfkörpers mit den Maßen 10 mm x 1 mm x 50 mm, sowie eine Nahaufnahme der Oberflächenstruktur nach der Reinigung und vor dem Versuchstart mittels Helium-Ionen-Mikroskop (Zeiss Orion NanoFab, Carl Zeiss, Jena).

Im Anschluss wurden steril und unter anoxischen Bedingungen 60 mL Soleprobe von Cav-B bzw. 55 mL Medium (Me-2) in die Serumflaschen abgefüllt. Für die Herstellung der Negativkontrollen wurde die verwendete Sole über einen Spritzenvorsatzfilter mit einer Porengröße von 0,2 µm sterilfiltriert. Danach erfolgte die Zugabe von Na₂S (1mM, Herstellung nach Cline 1969) bzw. des Inokulums (*Desulfovermiculus halophilus* DSM 18834, Belyakova et al. 2006), um die verschiedenen Testparameter einzustellen (Tabelle 11). Schließlich wurde den Positivkontrollen 2 bar H₂-Gas zugesetzt. Die Inkubation erfolgte ruhend bei 30 °C.

Tabelle 11 Zusammensetzung der Versuchsreihen für die Bestimmung mikrobiell induzierter Korrosion

Probe	Medium	Mikrobielle Gemeinschaft	H ₂ -Gas	Zusatz
VR1	Sole Cav-B	Nativ	Ja	-
KR1	Sole Cav-B	Nativ	nein	-
VR2	Sole, Cav-B, sterilisiert	-	Ja	-
KR2	Sole, Cav-B, sterilisiert	-	nein	-
VR3	Sole Cav-B	Nativ	Ja	Na ₂ S, 10 mM
KR3	Sole Cav-B	Nativ	nein	Na ₂ S, 10 mM
VR4	Medium	<i>D. halophilus</i> DSM 18834	Ja	Na ₂ S, 1 mM
KR4	Medium	<i>D. halophilus</i> DSM 18834	nein	Na ₂ S, 1 mM

2.7.1 Messung der mikrobiellen Wasserstoffoxidation

Für die Messung der Wasserstoff-Isotopen-Fraktionierung, wurden mit einer gasdichten Spritze 100 μL des Gasraumes aus den Versuchsansätzen entnommen und direkt manuell in den Injektor des Gaschromatographen injiziert. Die Messmethode basierte auf vorangegangenen Arbeiten (Löffler et al. 2019). Für die Auftrennung der Gase wurde eine Carboxen® Säule isotherm bei einer Temperatur von 40 °C verwendet. Die Flussrate des Trägergases Helium lag bei 1,2 mL min^{-1} , das Verhältnis von Probe zu Trägergas war dabei 1:25. Die Analyse erfolgte innerhalb von 300 Minuten, danach wurde die Temperatur im Ofen auf 200 °C erhöht und die Säule für mindestens 10 Minuten ausgeheizt, um eine gleichbleibende Messgenauigkeit beizubehalten. Nach der Auftrennung wurden die H_2 Moleküle durch Elektronenbeschuss ionisiert. Die Deflexion von HH (Masse 2) und HD (Masse 3) erfolgte in einem Magnetfeld bei einer Feldstärke von 0,75 T, was die Detektion in zwei Faradycups erlaubte. Die eintreffenden Signale wurden hier mittels Sekundärelektronenemission verstärkt. Aus den eintreffenden Signalen und mit den Werten des Referenzgases, wurde das Verhältnis von leichtem zu schweren H_2 berechnet. Das Wasserstoffisotopenverhältnis des Referenzgases lag bei -210 ‰ und wurde durch den Vergleich mit zwei Standards (SMOW, SLAP) festgelegt und in die Delta-Notation überführt.

Durch den Elektronenbeschuss während der Ionisation kann es des Weiteren zur Bildung von H_3^+ -Ionen kommen, welche durch ihre Masse ($M = 3$) das Ergebnis der HD-Messung verfälschen können (falsch positiv). Die Menge der gebildeten H_3^+ -Ionen ist jedoch direkt proportional zur Konzentration des injizierten H_2 -Gases und kann so, durch die Berechnung eines Korrekturfaktors, ausgeglichen werden.

Für die in dieser Arbeit durchgeführten Messungen wurde neben dem Referenzgas auch immer eine Gasprobe aus der Wasserstoff-Leitung des Labors vermessen, welche an dem Tag genommen wurde, an dem die Anreicherungskulturen mit Wasserstoff-Gas als Energiequelle angesetzt wurden. Alle Messungen wurden in technischen Triplikaten durchgeführt.

2.7.2 Optische Analyse der Oberflächenveränderung von Eisenprüfkörpern

Nach Beendigung der Inkubationszeit von 8 bzw. 15 Wochen wurden die Versuchsreihen abgebaut und die Eisenprüfkörper für die elektronenmikroskopische Messung vorbereitet. Dafür wurden diese über Nacht bei 4 °C in einer Fixierlösung inkubiert (2 % PFA in

Cacodylatpuffer, Tabelle 12). Nach der Fixierung wurden die Prüfkörper in Cacodylatpuffer gewaschen und schrittweise dehydriert, indem die Ethanolkonzentration in der Waschlösung erhöht wurde (30, 50, 70, 90, 95 und 100 % Ethanol abs. in Cacodylatpuffer). Diese Schritte erfolgten durch Immersion des Prüfkörpers in die entsprechende Lösung für jeweils 3 Minuten. Final wurden die Prüfkörper für je 10 Minuten in 50 und 100 % HMDS inkubiert und dann in einer sterilen Werkbank getrocknet (Tamisier et al. 2022).

Tabelle 12 Puffer und Lösungen für die elektronenmikroskopische Probenvorbereitung

Chemikalien	Herkunft
Paraformaldehyd; 16 %, EM Grade	EM Sciences, Hatfield, PA, USA
Ethanol abs.; min. 99,8 %	ChemSolute®, Th. Geyer GmbH & Co. KG, Renningen
Na-Cacodylat Puffer; pH 7,4; 0,2 M	EM Sciences, Hatfield, PA, USA
HMDS (Hexamethyldisilazan)	EM Sciences, Hatfield, PA, USA

Die Oberflächenstruktur des Prüfkörpers wurde in einem Rasterelektronenmikroskop (engl. *scanning electron microscope*, SEM, Stromstärke: 250 pA, Beschleunigungsspannung: 10 kV) bzw. einem Heliumionenmikroskop (HIM, Stromstärke: 0,1-0,8 pA, Energie: 25 keV) analysiert. Die elementare Zusammensetzung der Probenoberfläche wurde zusätzlich über energiedispersive Röntgenspektroskopie (engl. *energy dispersive X-ray spectroscopy*, EDX) bestimmt. Die Analyse erfolgte ebenfalls bei einer Elektronenenergie von 10 keV und war an das SEM gekoppelt.

Tabelle 13 Geräte zur Bestimmung mikrobiell induzierter Korrosion

Gegenstand	Hersteller
Spektrophotometer	Jenway™, 6705 UV/VIS, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
GC-IRMS System	Gaschromatograph: 7890A, Agilent Technologies; Injektor: Split-Splitless Injektor (Probe mit Helium mischen) Reaktor: GC-IsoLink (bei 500°C), Thermo Fisher Scientific; Conflo IV: (Druckausgleich vor MS, Referenzgaskontrolle), Thermo Fisher Scientific; Isotopenverhältnismassenspektrometer: Finnigan MAT 253, Thermo Fisher Scientific; Massen: 2,3 und 28,29,30 und 44,45,46 Säule: Carboxen® 1010 PLOT, 30 m x 0.32 mm Innendurchmesser 15 µm Schichtdicke, Supelco, Bellefonte, PA, Software: Isodat 3.0 Thermo Scientific
Rasterelektronenmikroskop	Zeiss Merlin VP Compact, Carl Zeiss, Jena
Röntgenspektrometer	Bruker Quantax XFlash Quad, Bruker Nanoanalytics, Berlin
Heliumionenmikroskop	Zeiss Orion NanoFab, Carl Zeiss, Jena

2.8 Einfluss von Wasserstoff-Gas auf mikrobielle Aktivität auf Einzelzellebene

Die Aktivität auf Einzelzellebene wurde in Mikroorganismen aus den Soleproben von Cav-B und Cav-C, sowie in der Anreicherungskultur MP-32 (vgl. Abschnitte 2.5.2, 2.6) untersucht. Für die Versuchsansätze mit MP-32 wurden 37,5 mL Medium bzw. Soleprobe unter anoxischen Bedingungen in 120 mL Serumflaschen abgefüllt und verschlossen. Im Anschluss wurde der Gasraum mit einem Gemisch aus N₂ und CO₂ im Verhältnis von 8:2 begast und mit 5 mL aus einer Vorkultur von MP-32 inokuliert (VR1, KR1-1, KR1-2, Tabelle 14). Von den Soleproben wurden jeweils 42,5 mL anoxisch abgefüllt, verschlossen und begast (VR 2, VR3, Tabelle 14). Im Anschluss erfolgte die Zugabe von 7,5 mL einer mit schweren Isotopen markierten Substratlösung. Diese bestand aus ¹³C-Bikarbonat (H¹³CO₃⁻) welches unter anoxischen Bedingungen in Deuteriumoxid (²H₂O) gelöst wurde. Der Anteil von ²H₂O betrug 15 % am Gesamtvolumen von 50 mL der Mikrokosmen. Markierter Kohlenstoff wurde in Form von ¹³C-Bikarbonat (H¹³CO₃⁻) zugegeben, die Konzentration betrug ebenfalls 15 % des Gesamt-Kohlenstoffs des Mediums bzw. der Kavernenprobe. Die Gasphase setzte sich aus einem Gemisch von N₂ und CO₂ im Verhältnis von 8:2 bzw. aus einem Gemisch von H₂, N₂ und CO₂ im Verhältnis von 5:3:2 zusammen, um den Effekt von H₂ Gas als Energiequelle zu untersuchen. Die intrazelluläre Inkorporation von Wasser und Kohlenstoff wurden mittels nanoSIMS nach einer Inkubationszeit von einem Monat gemessen. Als Referenz dienten Ansätze, die mit einer Substratlösung aus ¹H₂O und ¹²C-Bikarbonat inkubiert wurden.

Tabelle 14 Zusammensetzung der Versuchsreihen für SIP-basierte Einzelzellanalyse

Versuchsreihe	Medium	Mikrobielle Gemeinschaft	H ₂ -Gas ¹
VR1	Medium	MP32	50 %
KR1-1	Medium	MP32	0 %
KR1-2	Soleprobe Cav-B	MP32	50 %
VR2	Soleprobe Cav-B	Nativ	50 %
KR2	Soleprobe Cav-B	Nativ	0 %
VR3	Soleprobe Cav-C	Nativ	50 %
KR3	Soleprobe Cav-C	Nativ	0 %

¹ Anteil der Gasphase mit einem Gesamtvolumen von 70 mL

Für ein besseres Verständnis der möglichen Stoffwechselwege wurde das Metagenom der Anreicherungskultur, wie in Abschnitt 2.4.4. beschrieben, sequenziert.

2.8.1 Etablierung eines simultanen Nachweises von H und C Isotopen in halophilen Mikroorganismen

Für die simultane Bestimmung von H und C Isotopen in extrem halophilen Mikroorganismen mittels nanoSIMS waren folgende Optimierungen und Entwicklungen nötig. Es wurde zunächst eine Methode für die Präparation von extrem halophilen Zellen für das Hochvakuum etabliert, die auf vorangegangenen Arbeiten aufbaute (Calabrese et al. 2021). Außerdem wurden Fein-Einstellungen am nanoSIMS Gerät vorgenommen, die es erlaubten, gleichzeitig und sensitiv sowohl H-Isotope als auch C Isotope zu messen und die entsprechenden Daten auszuwerten. Da Messungen mit dem nanoSIMS zeit- und kostenintensiv sind, ist es wünschenswert pro Messung ausreichend viele mikrobielle Zellen im Sichtfenster aufzunehmen. Gleichzeitig sollten die Zellen ebenmäßig und einzeln (nicht überlappend) auf dem Trägermaterial, in diesem Fall einem Filter, verteilt sein, um klare Abgrenzungen zwischen den Zellen zu sehen. Aus Erfahrung ist bekannt, dass in einem Sichtfeld von $20 \times 20 \mu\text{m}^2$ 50 prokaryotische Zellen ideal sind. Bei einer verfügbaren Filterfläche von $15 \times 10^7 \mu\text{m}^2$ und einer geschätzten Zellgröße von ca. $2 \mu\text{m}$ ergeben sich so circa 2×10^7 Zellen pro Filter (Calabrese et al. 2021).

Für die Etablierung des Protokolls zur Probenvorbereitung, wurden Versuche mit dem halophilen Archaeum *Haloferax volcanii* durchgeführt, welches bei einer Salzkonzentration von 120 gL^{-1} kultiviert wurde. Die Zellzahl der Proben wurde vorab durch Färbung mit DAPI (Abschnitt 2.1.3) bestimmt, um ein entsprechendes Aliquot der Probe zu entnehmen. Die mikrobiellen Proteine wurden dann bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ für 12 Stunden mit PFA in einer finalen Konzentration von 3 % kreuzverlinkt (fixiert), was einer Lyse der Zellen durch die nachfolgende Dehydrierung vorbeugt. Im Anschluss wurden die fixierten Zellen auf einem mit Gold-Palladium (Au/Pd, 80:20, Schichtdicke 30 nm) beschichteten Filter, in einer speziell angefertigten Filtereinheit zurückgehalten und mit einem gleichen Volumen Cacodylat-Puffer gewaschen, um das Fixiermittel zu entfernen. Es wurde ersichtlich, dass es notwendig ist, die ursprüngliche Salzkonzentration der Probe schrittweise zu verringern, anstelle mit Puffer ohne NaCl zu waschen, daher wurden verschiedene Mengen Natriumchlorid in Cacodylatpuffer gelöst (12, 10, 8, 6, 4, 2, 0 Vol.%). Je 1 mL der hergestellten Lösungen wurden verwendet, um den Filter 90 Sekunden zu spülen. Schließlich wurde der Cacodylat-Puffer durch Ethanol ersetzt, indem in 9 Schritten der Ethanol-Anteil (10, 20, 30, 50, 70, 80, 90, 96

und 100 Vol.%) erhöht wurde. Dafür wurde der Filter mit 1 mL der Cacodylat-Ethanol-Mischung ebenfalls über einen Zeitraum von 90 Sekunden gespült. Nachdem final mit 100 % Ethanol gespült wurde, wurde die Filtereinheit auseinander gebaut und der Filter zum schnellen Trocknen auf ein Filterpapier überführt. Es wurde ebenfalls getestet, ob eine kritische Punkt-Trocknung in Frage kommt. Diese lieferte jedoch keine besseren Ergebnisse und wurde aufgrund des hohen CO₂-Verbrauchs verworfen.

Tabelle 15 Materialien und Geräte für die Untersuchung mikrobieller Aktivität auf Einzelzellebene

Gegenstand	Hersteller
Anaerobe Werkbank (97 % N ₂ ; 3 % H ₂)	Coy Laboratory Products, USA
pH Meter	ProLab 2000: Schott Instruments; SI Analytics, Weilheim, DE
Polykarbonat-Membranfilter; 0,45 µm; rund; 25 mm	Isopore™, Merck Millipore, Burlington, MA, USA
GTTP-Membranfilter; 0,2 µm; rund; 25 mm; mit 30 nm Au-Pd Beschichtung	Isopore™; Merck Millipore, Burlington, MA, USA
Polyethersulfon-Membranfilter; 0,1 µm; rund; 25 mm	Sartorius, Göttingen, DE
Angepasste Spritzenvorsatz Filtereinheit	UFZ Werkstatt
Hochvakuum-Beschichtungssystem	EM SCD500, Leica, Wetzlar
nanoSIMS 50L	Cameca, Gennevilliers Cedex, F
Rasterelektronenmikroskop	Zeiss Merlin VP Compact, Carl Zeiss, Jena
Exsikkator	Aquastop, Van der Heijden, Dörentrup

Da Messungen am nanoSIMS kostenintensiv und zeitaufwendig sind, ist es essenziell, während einer Messung die größtmögliche Menge an Information aus der Probe zu holen können. Das heißt, es sollten neben den Wasserstoff-Isotopen auch möglichst viele verschiedene Ionen (zelluläre Eigenmarker, Identität-/HISH-Marker, Aktivitäts-/Isotopen-Marker) extrahiert werden (H, C, C₂, CN, S, P, PO_x). Mit Scharfstellung elektrostatischer Linsenelemente und Verwendung verschiedener Variationen in den Ablenkerspannungen wurde der Primär- sowie der Sekundärionenstrahl fein fokussiert, um eine besonders hohe

Trennschärfe der Ionenmassen zu ermöglichen. Dies erlaubte eine direkte Messung der Kohlenstoff- und Wasserstoff Verhältnisse, und, wenn erwünscht, auch der Stickstoff- und Schwefel Verhältnisse. Zunächst wurden verschiedene H-haltige Ionen (H^- , CH^- , OH^- , C_2H^-) extrahiert und das $^1H/^2H$ Isotopenverhältnis analysiert, um eine reproduzierbare und präzise Auswertung metabolischer Aktivität aus der Messung zellulärer 2H -Aufnahmen zu erhalten (Anhang 8.2).

Die verwendeten Chemikalien wurden, wenn nicht anders angegeben, von Th. Geyer GmbH & Co. KG bezogen. Lösungen wurden, wenn nicht anders angegeben, selbst hergestellt.

Tabelle 16 Chemikalien und Lösungen die Untersuchung mikrobieller Aktivität auf Einzelzellebene

Chemikalien/Lösungen	Herkunft
Paraformaldehyd; 16 %; EM Grade	EM Sciences, Hatfield, PA, USA
Ethanol abs.; min. 99,8 %	ChemSolute®
Na-Cacodylat-Puffer, pH 7,4	EM Sciences, Hatfield, PA, USA
Phosphat-gepufferte NaCl-Lösung; pH 7,4; 10x	Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
$NaH^{13}CO_3$; 99.9%	Sigma-Aldrich, DE
2H_2O ; 99.9%	Sigma-Aldrich, DE

2.8.2 Quantifizierung aktiver Mikroorganismen mittels nanoSIMS

Das in Abschnitt 2.8.1 beschriebene Protokoll wurde auch für die SIP-Experimente mit den Kavernenproben angewandt. Hier war es jedoch nötig deutlich mehr Probenvolumen zu filtrieren, da die Zellzahl sehr gering war. Mit einer Flussrate von 1 mL pro Minute wurden 50 mL Kulturflüssigkeit, i.e. der Inhalt einer Serumflasche, nach der Fixierung abfiltriert. Da die Salzkonzentration der Kavernenproben bei 4,7 M lag, wurde ab einer Start-Konzentration von 4,7 M NaCl in Cacodylat-Puffer entsalzt. Um nicht zu viele Waschschriffe durchzuführen, wurde weiter mit 20, 15, 10 und 5 % NaCl in Cacodylatpuffer entsalzt. Die Ethanolreihe und anschließende Lufttrocknung der Filter wurden beibehalten.

Von den getrockneten Filtern wurde ein 0,4 cm² großes Stück ausgestanzt und für die Analyse auf den Probenhalter des nanoSIMS montiert. Im positiven Extraktionsmodus wurden die folgenden Ionen akquiriert: ¹H⁻, ²H⁻, ¹⁶O¹H⁻, ¹⁶O²H⁻, ¹²C₂⁻, ¹²C ¹³C⁻, ¹²C₂¹H⁻, ¹²C₂²H⁻, ¹²C¹⁴N⁻, ¹³C¹⁴N⁻. Dafür wurde eine Probenfläche von 100 x 100 μm² mit Cs⁺-Ionen pre-implantiert (200 pA, 16 keV, 15 min). Innerhalb dieses Feldes wurde für die Analyse ein 50 x 50 μm² großes Sichtfeld (Analysefeld, engl. *field of view*, FoV) ausgewählt. Die Extraktion der Ionen erfolgte bei einer Ionenstrahl-Stromstärke von 4 pA (Durchmesser: 50-70 nm), dabei wurde das FoV mit einer 512 x 512-pixel Rastergröße und für 2 ms pro Pixel gescannt. Insgesamt wurden 40 Scans pro FoV aufgenommen. Mit der Matlab Software Look@NanoSIMS (LANS) wurden die Ionenanzahl in 20 Scans pro FoV akkumuliert und um die räumliche Drift während der Messung korrigiert. Das ¹²C¹⁴N⁻-Signal diente zur Identifikation der Zellen. Die Position jeder Zelle wurde gespeichert (engl. *region of interest*, ROI), um innerhalb des ROIs das Verhältnis von ¹³C zu ¹²C (mittels CN⁻-Ionen) und ²H zu ¹H (mittels C₂H⁻-Ionen) zu berechnen. Die relative Häufigkeit von ¹³C und ²H (natürliche Isotopenverhältnisse) wurde in mikrobiellen Zellen ohne Isotopenmarkierung bestimmt und als Nullwert definiert. Die graphische Darstellung der Daten erfolgte mit OriginPro 2022.

2.9 Auswirkungen von Salzgehalt und Kohlenstoffquellen

Um zu testen welchen Einfluss verschiedene C Quellen und der Salzgehalt auf Proliferation und Metabolismus einer Anreicherungskultur haben, wurde zusammen mit der Firma MicroPro GmbH folgender Versuchsansatz durchgeführt. Mikrokosmen (S1-S3) wurden in drei Salzgehaltsstufen mit CO₂ als C Quelle vor-kultiviert und dann für den Versuch in Medium (vgl. Abschnitt 2.5.3) mit verschiedenen Salzgehalten (niedrige NaCl-Konzentration mit 2,5 M (S4, S7, S10, S13), mittlere NaCl-Konzentration mit 3,4 M (S5, S8, S11, S14) und hohe NaCl-Konzentration mit 4,4 M (S6, S9, S12, S15)), 14 mM Sulfat und einem Gasgemisch aus 80 % H₂ und 20 % CO₂ (2000 mbar) inkubiert (Tabelle 18). Jede Anreicherungskultur wurde mit einem C-Substrat versetzt, das 10 mM Acetat (S4, S5, S6), 8 mM Laktat (S7, S8, S9) oder 10 mM Methanol (S10, S11, S12) war. Ein Satz wurde ohne zusätzliche Kohlenstoffquelle inkubiert (S13, S14, S15). Acetat und Laktat wurden in 2 M Stammlösungen aus ihrem Natriumsalz bei neutralem pH-Wert hergestellt. Beide Stammlösungen und Methanol (≥ 99,8 %) wurden entgast und anschließend mit Hilfe einer anaeroben Werkbank steril in 120-mL-Serumflaschen gefiltert. Alle Kulturen wurden in den Serumflaschen bei einer Temperatur von 30 °C und einem pH-Wert zwischen 7,2 und 7,5 für eine Inkubationszeit von 125 d gehalten. Während dieser Zeit wurden die Zellzahl, die Acetat-, Laktat- und Sulfatkonzentration sowie die Zusammensetzung der Gasphase in Intervallen von 20 bis 25 d überwacht. Nach der Inkubationszeit wurde die Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaft durch 16S rRNA-Gen-basierte Amplikonsequenzierung bewertet. Als die Proben subkultiviert wurde, wurde nach einer Gesamtbebrütungszeit von 1445 Tagen die Sulfatkonzentration erneut gemessen und vier Proben (S11, S12, S14 und S15) für die Metagenom-Sequenzierung ausgewählt. Für die Kultivierung wurde das in Tabelle 18 gelistete Basismedium verwendet und nach dem Autoklavieren pro Liter Medium mit 1 mL Spurenelement-Lösung (Widdel et al. 1983; Widdel und Pfennig 1981), 2 mL Vitamin-Lösung (Wolin et al. 1963), 2 mL Selen-Wolfram-Lösung, 30 mL einer 1 M Bicarbonat-Lösung und 10 mL Natrium-Dithionit versehen (vgl. Abschnitt 2.5, Tabellen 7 und 8).

Tabelle 17 Zusammensetzung der Versuchsreihen zur Bestimmung der Auswirkung von Salzgehalt und C Quellen auf mikrobielles Wachstum

Initialkultur	Vorkultur	Versuchsreihe	NaCl Gehalt	Probe	C Quelle
		VR1-1	2.5 M	S04	Acetat + CO ₂
	SF-X-15	VR2-1	2.5 M	S07	Laktat + CO ₂
		VR3-1	2.5 M	S10	Methanol + CO ₂
		VR4-1	2.5 M	S13	CO ₂
SF-X	SF-X-20	VR1-2	3.4 M	S05	Acetat + CO ₂
		VR2-2	3.4 M	S08	Laktat + CO ₂
		VR3-2	3.4 M	S11	Methanol + CO ₂
		VR4-2	3.4 M	S14	CO ₂
		VR1-3	4.4 M	S06	Acetat + CO ₂
	SF-X-26	VR2-3	4.4 M	S09	Laktat + CO ₂
		VR3-3	4.4 M	S12	Methanol + CO ₂
		VR4-3	4.4 M	S15	CO ₂

Die Anionen (Sulfat, Acetat, Laktat) und die Zusammensetzung der Gasphase wurden während des gesamten Versuchs in Abständen von 20-25 Tagen analysiert. Für die Konzentrationsbestimmung der Anionen wurde 1 mL der Zellsuspension mit sterilen Einwegspritzen aseptisch aus den Kulturflaschen entnommen, filtriert und bis zur Messung bei -18 °C in 1,5 mL Reaktionsgefäßen gelagert. Für die Konzentrationsbestimmung wurde ein mit Wärmeleitfähigkeitsdetektor ausgestatteter Ionenchromatograph genutzt (2.5.4). Die Proben wurden mikroskopisch untersucht, um die Gesamtzahl der Zellen zu bestimmen und die Zellmorphologie zu untersuchen. Die Zellzahlen wurden mit Hilfe der Phasenkontrastmikroskopie (Vergrößerung 1:1.200) unter Verwendung einer THOMA-Zählkammer bestimmt (2.5.4). Die Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaft bei Versuchsende wurde mittels Amplikon-Sequenzierung (Illumina MiSeq, 2 x 300 bp) bestimmt. Von jeder Probe wurden nach Versuchsende 2 x 2 mL Kulturflüssigkeit entnommen und auf PES-Filter abfiltriert. Nach der DNA-Extraktion (2.4.1) wurden die DNA Extrakte Für die Amplikonsequenzierung zu LGC Genomics, Berlin, versandt. Dort wurden zwei Primerpaare für die Amplifikation von bakterieller und archaeeller DNA. Letztere wurde in einem nested-PCR Ansatz erzeugt, in welchem zunächst ein 660 bp langes Archaeen-spezifisches Amplikon

erzeugt wurde, welches dann als Ausgangsmaterial für die Amplifikation und Adapterligation mit dem Primerpaar nach Sundberg (2013) diente (2.4.2). Die Rohdaten wurden, wie in Abschnitt 2.4.3 beschrieben, ausgewertet. Nach erfolgter Analyse wurden vier Proben für eine Metagenomsequenzierung ausgewählt und durch die Zugabe von Sulfat, der entsprechenden C-Quelle und H₂-Gas angereichert, um ausreichend DNA extrahieren zu können. Für die Sequenzierung (Illumina NovaSeq, 2 x 150 bp) des Metagenoms wurde Azenta Inc., Leipzig, beauftragt. Die Auswertung der Rohdaten erfolgte wie in Abschnitt 2.4.4 beschrieben.

3 Ergebnisse

In dieser Arbeit wurden halophile Mikroorganismen und deren H₂-konsumierende, anaerobe Stoffwechselwege in Verbindung mit der Untergrundspeicherung von H₂-Gas untersucht. Als Speicher sollen künftig Salzkavernen dienen, die bereits seit mehreren Jahrzehnten als UGS für Erdgas genutzt werden. Zu mikrobiologischen Struktur- und Funktionsbeziehungen in diesen Salzkavernengasspeichern gibt es jedoch kaum Information. Es war also notwendig, zunächst Proben aus diesen Erdgaskavernen zu gewinnen und zu testen, ob die Kavernen mikrobiell besiedelt sind (H1, Kapitel 3.1). Mit den gewonnenen Soleproben wurden Mikrokosmen angesetzt, um zu analysieren, welchen Einfluss die Speicherung von H₂-Gas auf mikrobielle Stoffwechselwege, mikrobiell induzierte Korrosion (H2, Kapitel 3.2), sowie die Aktivität einzelner Zellen hat (H3, Kapitel 3.3). Anhand einer Anreicherungskultur wurde außerdem getestet, welche Auswirkungen Metabolite aus heterotrophem Stoffwechsel sowie variierende Salzkonzentrationen auf Sulfatreduktion und Homoacetogenese haben (H4, Kapitel 3.4).

3.1 Erdgaskavernen als mikrobielles Habitat

3.1.1 Technische und biophysikalische Parameter der beprobten Erdgaskavernen

Insgesamt wurden fünf Kavernen beprobt, Cav-A, Cav-B, Cav-C, Cav-D und Cav-E. Diese befanden sich in einem Kavernenfeld in Mitteldeutschland. Jede Kaverne hatte ein Arbeitsvolumen von circa 500.000 m³ und wurde mit einem Arbeitsdruck zwischen 76 und 126 bar betrieben. Die Tiefe des Solesumpfes in jeder variierte von Kaverne zu Kaverne und lag zwischen 2,5 und 8 m (Tabelle 17). Bei einer Tiefe von weniger als 4 m war es notwendig den Probenehmer mehr als einmal abzuteufen, um genügend Probenmaterial von den Kavernen Cav-A und Cav-D zu gewinnen. Für die kurzfristige weitere Probenahme von Kaverne Cav-B wurde mit einer anderen Firma und einem anderen Probenehmer gearbeitet, was dazu führte, dass auch diese Kaverne, obwohl der Sumpf ausreichend tief war, mehrmals am gleichen Tag beprobt werden musste. Die pH-Werte der Sole lagen bei 6,2 (± 0,2) und die Temperatur im Inneren variierte zwischen 24,5 und 27,9 °C. Die Bestimmung der mikrobiellen Zellzahl mittels Lichtmikroskopie und DAPI-Färbung ergab 2,0 bis 7,0 x 10⁶ Zellen mL⁻¹ (Tabelle 17).

Tabelle 18 Kavernenparameter und -daten

Die Tiefe der Kavernen und ihrer Sümpfe wurden mittels Echolot- und Leitfähigkeitsmessungen bestimmt. Die Anzahl der Abteufungen ergab sich aus der Tiefe des Sumpfes. Der pH-Wert wurde in einem Aliquot der gewonnenen Sole gemessen, die Temperatur und der Druck wurden direkt am Kavernenspeicher gemessen. Die Zellzahl Bestimmung erfolgte durch DAPI-Färbung aus einem 10 ml Aliquot.

Kaverne	Cav-A	Cav-B	Cav-C	Cav-D	Cav-E
Sumpfspiegel / m	876,8	863	919,0	866,2	908,6
Kavernengrund / m	879,3	871	926,2	868,9	916,3
Sumpftiefe / m	2,5	8	7,2	2,7	7,7
Abteufungen / #	2	3	1	2	1
pH-Wert Sole	6,2	6,2	6,0	6,4	6,5
Temperatur Sole / °C	27,9	24,5	27,8	25,8	25,9
Kopfdruck / bar	119	76	107	126	120
Zellzahl / mL ⁻¹	2,5 x 10 ⁶ (±2,4x10 ⁵)	7,0 x 10 ⁶ (±1,1x10 ⁶)	2,0 x 10 ⁶ (±5,7x10 ⁵)	4,0 x 10 ⁶ (± 3,3x10 ⁵)	3,9 x 10 ⁶ (± 1,7x10 ⁵)

3.1.2 Hydrochemie der Kavernensole

Die NaCl-Konzentrationen lagen für jede Kaverne bei 4,7 M (Tabelle 18), was einer Salinität von 27,5 % entspricht. Gemäß der Zusammensetzung des Salzgesteins war die Konzentration von Sulfat am zweithöchsten und lag zwischen 34,7 und 52,0 mM. Kalium (0,8 -1,6 mM) und Ammonium (0,2-0,7 mM) wurden ebenfalls in allen Kavernen nachgewiesen, jedoch in geringeren Konzentrationen. Weitere Substanzen, die neben Sulfat als Elektronenakzeptor dienen können und in manchen Kavernen in Spuren nachgewiesen wurden, waren Nitrat, Nitrit, Phosphat und Eisen (Tabelle 18). Die Kohlenstoffquellen für eine mögliche Produktion von Zellmaterial waren divers. Die DOC Konzentration lag zwischen 190 und 270 mg L⁻¹ und war in Cav-A mit 460 mg L⁻¹ besonders hoch. Der TIC lag bei den leicht sauren pH-Werten von 6,3 ± 0,2 vermutlich als H₂CO₃ und HCO₃⁻ vor. Der Kohlenwasserstoffindex, welcher die Anwesenheit von Mineralölkomponenten in wässrigen Lösungen zusammenfasst, war zwischen 0,2 und 7 mg L⁻¹. Er war in der Sole von Kaverne Cav-A (7 mg L⁻¹) am höchsten und unterhalb der Nachweisgrenze in der Soleprobe von Kaverne Cav-D. Des Weiteren wurden Methanol (11,8 - 37,6 mM), Ethanol (0,4 - 6,9 mM), Isopropanol (0,005 - 0,9 mM) und Butyrat

(0,5 - 0,7 mM) in der Sole aller Kavernen nachgewiesen. Geringe Konzentrationen von Formiat (0,01 - 0,08 mM) wurden in allen Kavernen außer Kaverne Cav-C nachgewiesen. Im Gegensatz dazu konnte ausschließlich in der Sole dieser Kaverne (Cav-C) Laktat (0,06 mM) nachgewiesen werden. Acetat wurde in der Sole von Kavernen Cav-A und Cav-B (0,5 mM) nachgewiesen. Diese Kavernen (Cav-A, Cav-B) waren jene, die vor der Jahrhundertwende Leuchtgas speicherten.

Tabelle 19 Hydrochemische Zusammensetzung der Soleproben

Parameter	Cav-A	Cav-B	Cav-C	Cav-D	Cav-E
KW-Index / mg L ⁻¹	7,0	0,25	0,51	<0,3	0,58
DOC / mg L ⁻¹	460	220	270	250	190
TIC / mg L ⁻¹	100	120	73	62	55
Methanol /mM	37,45	19,35	23,72	31,21	11,86
Ethanol /mM	6,95	0,41	0,91	2,61	4,78
Isopropanol /mM	0,865	0,07	0,008	0,005	0,073
Formiat /mM	0,009	0,084	<0,002	0,009	0,011
Acetat /mM	0,508	0,454	<0,002	<0,002	<0,002
Laktat /mM	<0,001	<0,001	0,062	<0,001	<0,001
Propionat /mM	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
n-Butyrat /mM	0,499	0,717	0,494	0,54	0,517
Chlorid /mM	5259,6	5366,3	5666,0	5359,6	5263,1
Nitrit /mM	0,001	<0,00043	0,00043	<0,00043	<0,00043
Nitrat /mM	0,013	<0,008	0,011	<0,008	0,034
Sulfat /mM	36,45	34,65	39,34	41,76	51,96
Ammonium /mM	0,70	0,62	0,56	0,44	0,21
Phosphat /mM	0,03	<0,001	0,01	0,04	0,01
Fe(II)/Fe(III) /mM	<0,005	0,013	<0,005	0,076	<0,005
Kalium /mM	1,56	1,51	1,46	1,13	0,80
Natrium /mM	4723,4	4794,7	4759,9	4726,0	4653,8

3.1.3 Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaft der beprobten Kavernen

Aus je 500 mL Sole der verschiedenen Kavernen konnte ausreichend DNA für eine Analyse der mikrobiellen Gemeinschaft mittels Amplikon-Sequenzierung extrahiert werden, jedoch nicht für Metagenom-Sequenzierung. Insgesamt konnten aus den technischen Duplikaten nach der Sequenzierung 518.088 Reads erhalten werden. Die Anzahl der Reads pro Probe variierte dabei zwischen 34.682 und 71.260. Aus den Daten konnten 881 Amplikon-Sequenz-Varianten (ASVs) erstellt werden, wovon 118 Archaeen und 762 Bakterien zugeordnet wurden. Dominierende Phyla waren *Proteobacteria*, *Halobacterota*, *Bacteroidota*, *Firmicutes*, *Actinobacteriota*, *Halanaerobiaeota* und *Desulfobacterota*, die 91 % der mikrobiellen Gemeinschaft darstellten (Abbildung 8).

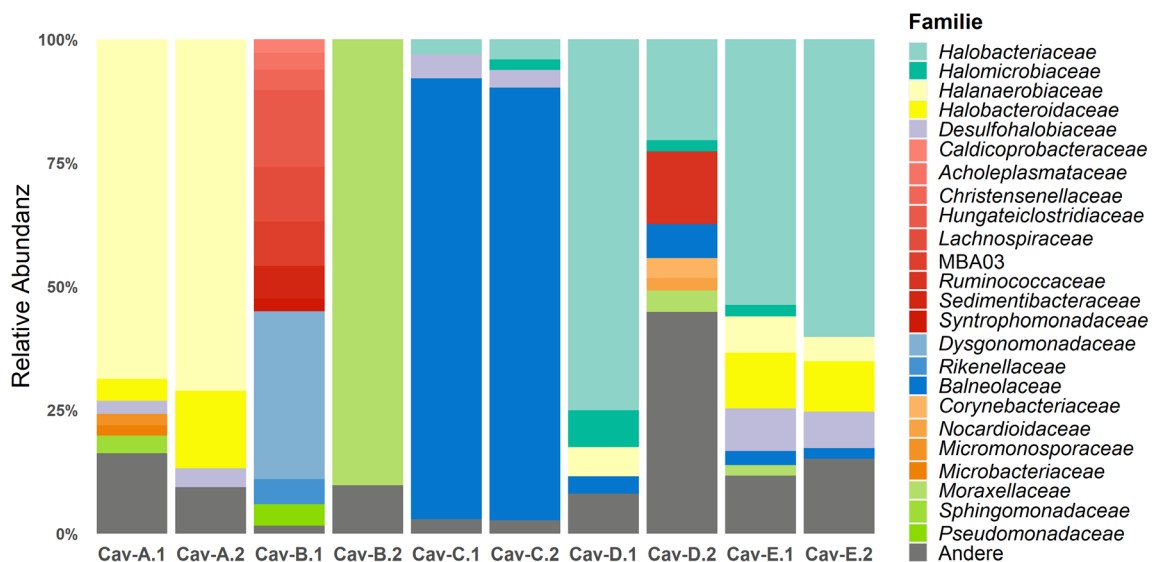


Abbildung 8 Relative Abundanz halophiler Mikroorganismen in den beprobten Erdgaskavernen

Amplikon-Sequenzvarianten (ASVs) auf Basis der variablen Region 4 (Primerpaar 515F/806R; Caporaso 2011) des 16S rRNA Gens. ASVs mit einer Abundanz von $\leq 3\%$ sind in grauen Balken zusammengefasst, aufgrund des limitierten Probenmaterials wurden jede Soleprobe in technischen Duplikaten bearbeitet, die als 1 und 2 gekennzeichnet sind. Übergeordnete Farbgebung der Phyla: Türkis, *Halobacterota*; Gelb, *Halanaerobiaeota*; Lila: *Desulfobacterota*; Rot: *Firmicutes*; Blau: *Bacteroidota*; Orange: *Actinobacteriota*; Grün: *Proteobacteria*. Details zu den Familien sind der Legende neben der Abbildung zu entnehmen.

Die verbleibenden 9 % verteilten sich auf 21 weitere Phyla. Weiterhin waren die dominierenden Phyla gewöhnlich durch 2 bis 4 Familien repräsentiert, ausgenommen

Firmicutes, von welchen 9 Familien detektiert wurden. Das Phylum *Desulfobacterota*, hingegen, wurde ausschließlich von Mitgliedern der Familie *Desulfohalobiaceae* repräsentiert. Die technischen Duplikate der Kavernen Cav-A, Cav-C, Cav-D und Cav-E lieferten konsistente Ergebnisse, allein bei der Probe von Kaverne Cav-B waren Unterschiede festzustellen (Abbildung 8). Im Replikat Cav-B.1 dominierten *Firmicutes* und *Bacteroidota*, während das andere Replikat (Cav-B.2) eine Dominanz von Mitgliedern der Familie *Moraxellaceae* zeigte. In den Proben der Kaverne Cav-A waren *Halanaerobiaceae* (70 %) abundant, während die Proben von Kaverne Cav-C von *Balneolaceae* (88%) und die von Kavernen Cav-D und Cav-E von *Halobacteriaceae* (52 %) dominiert wurden. *Halobacteriaceae* wurden auch in geringerer Abundanz in den anderen Kavernenproben (4 - 10 %) gefunden, genauso wie *Desulfohalobiaceae* (3 - 7 %) und *Halanaerobiaceae* (0,1 - 7 %). Insgesamt wurden in allen Kavernen 6 Familien detektiert, die das zentrale Mikrobiom der untersuchten Salzkavernen bilden und sich aus *Halomicrobiaceae*, *Halobacteriaceae*, *Halobacteroidaceae*, *Halanaerobiaceae*, *Desulfohalobiaceae* und *Balneolaceae* zusammensetzten.

3.2 Einfluss von Wasserstoff-Gas auf Sulfidogenese und MIC

3.2.1 Einfluss auf Proliferation und Metabolismus

Um den Einfluss einer möglichen Wasserstoffspeicherung auf das Solemikrobiom zu testen, wurden die Soleproben der jeweiligen Kavernen nativ (VR 1 - 5) und mit einem Inokulum (MP-32, KR 1 - 5) in Mikrokosmenansätzen inkubiert (Tabelle 10). Um die Kavernenbedingungen während der Wasserstoffspeicherung zu simulieren, wurden die Mikrokosmen mit Steinsalz als C Quelle und H₂ als Energiequelle angesetzt. Die Versuchsansätze mit den natürlichen Soleproben (Abbildung 9 A) zeigen, dass bei der Probenahme teilungsfähige Mikroorganismen aus den Kavernen Cav-A, B, C und D gewonnen werden konnten, wohingegen in der Soleprobe aus Cav-E kein mikrobielles Wachstum nachweisbar war. Dies wurde durch die Kontrollansätze bestätigt (Abbildung 9 B). MP-32 proliferierte nur in KR 1-4, in diesen Ansätzen mit Soleproben von Cav-A, B, C und D stieg die Zellzahl exponentiell an, was in dem Ansatz mit der Soleprobe von Cav-E (KR 5) nicht der Fall war. Insgesamt war die Zellzahl war mehr als doppelt so hoch, als in den Ansätzen ohne Inokulum und die stationäre Phase war nach 126 bis 182 Tagen erreicht. Eine noch höhere Zellzahl wurde nur in dem Kontrollansatz gemessen, in welchem die Anreicherungskultur in einem definierten, mineralischen Medium (Me-1, KR 6) inkubiert wurde. Der Salzgehalt im Medium war vergleichbar mit dem der Sole (5,1 M in Me-1 vs. 4,7 in den Soleproben, vgl. Abschnitt 3.1.2), aber im Vergleich zu den Soleproben war die Konzentration von Ammonium und Kalium in Me-1 erhöht, des Weiteren waren Spurenelemente und Vitamine zugegeben worden. Die Sulfatreduktion in den inokulierten Ansätzen kann anhand der 16S rRNA Gen Sequenzierung auf *Desulfohalobiaceae* spp. zurückgeführt werden, deren relativer Anteil in den Soleproben bei >80 % lag (Abbildung 10 A). Ab dem 28. Versuchstag wurde nur in den inokulierten Soleproben ein Sulfat- und Wasserstoffverbrauch von 5 bzw. 32 mM (27,5 bzw. 175,8 μmol dm³ d⁻¹) gemessen und das dabei entstandene Sulfid präzipitierte als FeS (Abbildung 10 B). In den nicht inokulierten Ansätzen war die Gemeinschaftsstruktur diverser, aber auch hier nahm der relative Anteil von *Desulfohalobiaceae* spp. im Vergleich zu den *in-situ*-Werten zu (vgl. Abschnitt 3.1.3).

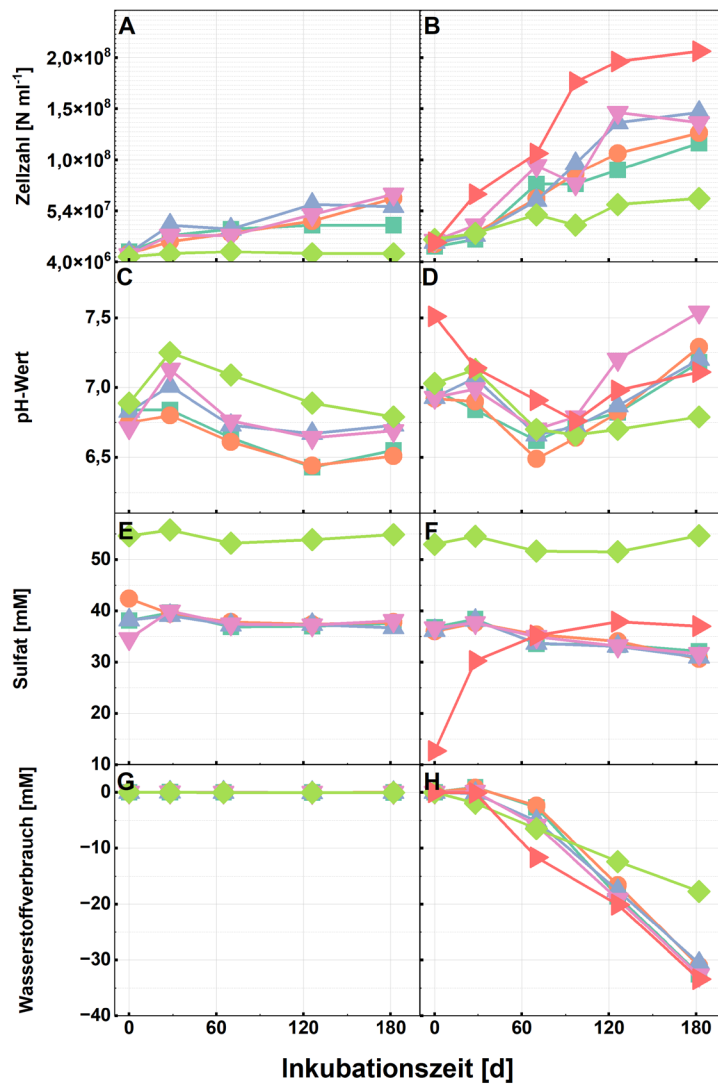
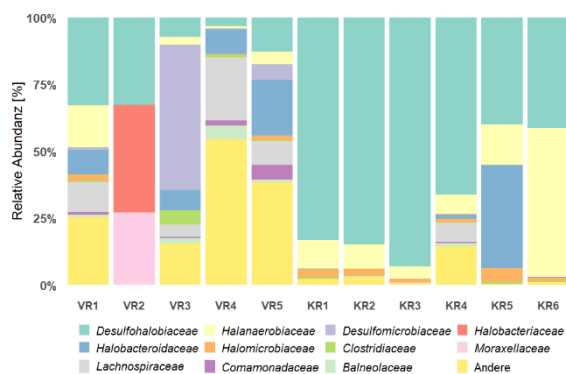


Abbildung 9 Mikrobielle Proliferation in salzgesättigten Soleproben

Nach der Probenahme wurden die Soleproben jeder Kaverne anaerob in Serumflaschen abgefüllt und mit Wasserstoff inkubiert. Zellzahl (A, B), pH-Wert (C, D), Sulfat- (E, F) und Wasserstoffverbrauch (G, H) wurden über einen Zeitraum von 182 Tagen gemessen. Als Positivkontrolle dienten Versuchsansätze die mit der Anreicherungskultur MP-32 inokuliert wurden (B, D, F, H). Die Farbgebung spiegelt die Herkunft der Soleprobe wider: ■ Cav-A, ■ Cav-B, ■ Cav-C, ■ Cav-D, ■ Cav-E, ■ Me-1. Aufgrund des limitierten Materials bestand pro Probe nur ein Ansatz.

Durch das in den Soleproben vorhandene Butyrat (0,5 - 0,7 mM, vgl. Abschnitt 3.1.2) kann eine heterotrophe Sulfatreduktion nicht ausgeschlossen werden. Die Kultivierung von MP-32 in definiertem Medium ohne C Quelle (KR 6) zeigte aber, dass autotrophe Sulfatreduktion möglich war. Auffällig war außerdem, dass der relative Anteil der *Halanaerobiaceae* spp. nach der Inkubation in der Kavernensole deutlich geringer war als nach Inkubation in Medium (Abbildung 10 A).

A



B



C

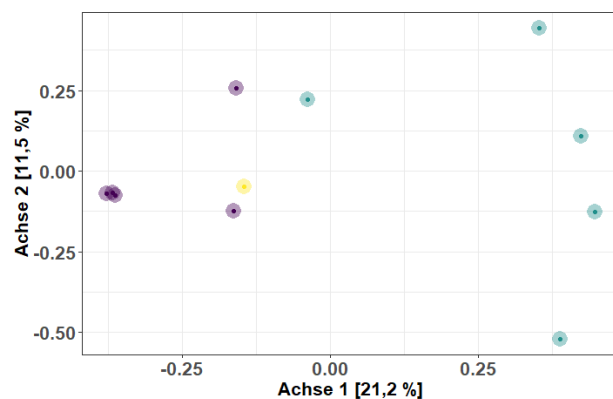


Abbildung 10 Mikrobielle Diversität in salzgesättigten Soleproben

A: Relative ASV-Abundanz auf Familienebene in VR 1-5 (Soleproben der Kavernen A-E), KR 1-5 (mit MP-32 inokulierte Soleproben der Kavernen) sowie KR 6 (MP-32 in Medium 1) nach Inkubation mit H₂. ASVs mit einer relativen Abundanz von < 5 % wurden zusammengefasst (Andere)

B: Nicht inokulierte (links) vs. inokulierte Soleprobe (rechts) nach 182 Tagen Inkubation (Exemplarisch von Cav-A).

C: Hauptkoordinatenanalyse der ASV-Daten auf Basis der Bray-Curtis-Distanz ● MP-32 (KR6), ● inokulierte Ansätze (KR1-5) ● native Ansätze (VR1-5).

3.2.2 Einfluss von H₂ auf mikrobiell induzierte Korrosion an Eisenprüfkörpern

Für die Analyse mikrobiell induzierter Korrosion wurden EPK mit den Soleproben inkubiert und nach 42 und 105 Tagen Inkubation makroskopisch und mikroskopisch analysiert (VR 1). Zum Vergleich wurde zusätzlich sterilisierte Sole (VR 2) und sterilisierte Sole mit künstlich zugegebenem Sulfid (VR 3) untersucht. Die EPK wurden außerdem in mineralischem Medium, welches mit der Reinkultur *D. halophilus* inokuliert wurde, untersucht (VR 4). Die Versuche wurden mit (VR 1 - 4) und ohne H₂ Atmosphäre durchgeführt (KR 1 - 4, Tabelle 11). In VR 1 war nach 42 und 105 Tagen Inkubation keine Veränderungen auf der Oberfläche des EPK festzustellen (Abbildung 11 AF). Risse und Unebenheiten hatten ein Ausmaß, das mit dem der Negativkontrolle (KR 1) und des unbehandelten EPK (Abbildung 6) vergleichbar war (Abbildung 11 BCGH). In VR 3 und 4 (Positivkontrollen) wurde eine schwarze Kruste auf dem EPK sichtbar (Abbildung 11 AF), die auf mikroskopischer Ebene eine Flocken-ähnliche Morphologie und kristalline Struktur aufwies (Abbildung 11 DEIJ). Ihre Zusammensetzung aus FeS wurde durch energiedispersive Röntgenspektroskopie zugeordnet und erfolgte in VR 3 durch die Reaktion von Eisen mit dem künstlich zugegeben Sulfid ($Fe^{+} + HS^{-} \rightarrow FeS \downarrow + H^{+}$). In VR 4 wurde Sulfid durch mikrobielle Sulfatreduktion gebildet, gleichzeitig breitete sich die Kruste nicht nur flächendeckend, wie in VR 3 (Abbildung 11 DI), auf dem EPK aus, sondern stellenweise auch in die Höhe (Abbildung 11 EJ). *D. halophilus* (*Desulfohalobiaceae*) proliferierte auf den EPK und wurde durch die Sulfidbildung und die sich anschließende Reaktion mit Eisen von FeS umschlossen, was die Aufwüchse der Kruste erzeugte. Dies war in den Ansätzen ohne Wasserstoff nicht der Fall, die Bildung der FeS Kruste durch *D. halophilus* erfolgte langsamer (KR 4, Abbildung 12 EJ), beziehungsweise blieb ganz aus (KR 1-3, Abbildung 12 B-D, G-I). Was den Rückschluss zulässt, dass *D. halophilus* unabhängig von H₂ zu der Bildung der Kruste führt und dass H₂, in abiotischen Systemen mit 10 mM Sulfid, die Bildung der Kruste verstärkte. Da weder eine Zellzahlbestimmung in der Kulturflüssigkeit noch eine Konzentrationsbestimmung von Sulfid repräsentativ war, wurde die mikrobielle Aktivität über die Veränderung der Wasserstoffisotopensignatur gemessen.

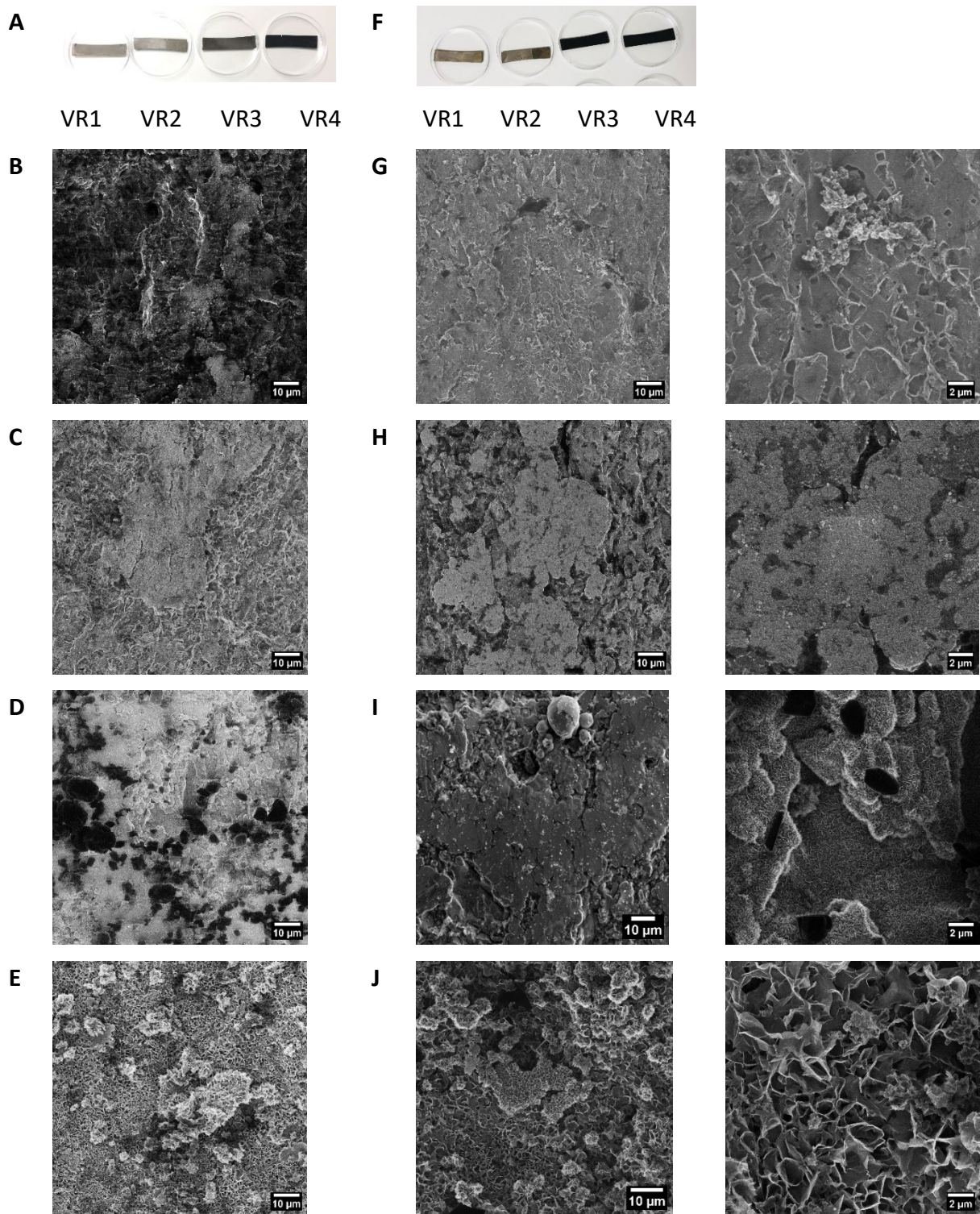


Abbildung 11 Oberflächenbeschaffenheit von Eisenprüfkörpern nach Inkubation in Soleproben unter H_2 Atmosphäre

Die Eisenprüfkörper wurden 42 (A) und 105 (F) Tage in Soleproben (VR1, BG), sterilisierter Sole (VR2, CH), in sterilisierter Sole mit Sulfid (VR3, DI) und mit *D. halophilus* (VR4, EJ) inkubiert. Die repräsentativen Aufnahmen zeigen eine Oberflächenübersicht (B-E) nach 42 Inkubationstagen, sowie eine Übersicht mit Nahaufnahme (G-J) nach 105 Inkubationstagen.

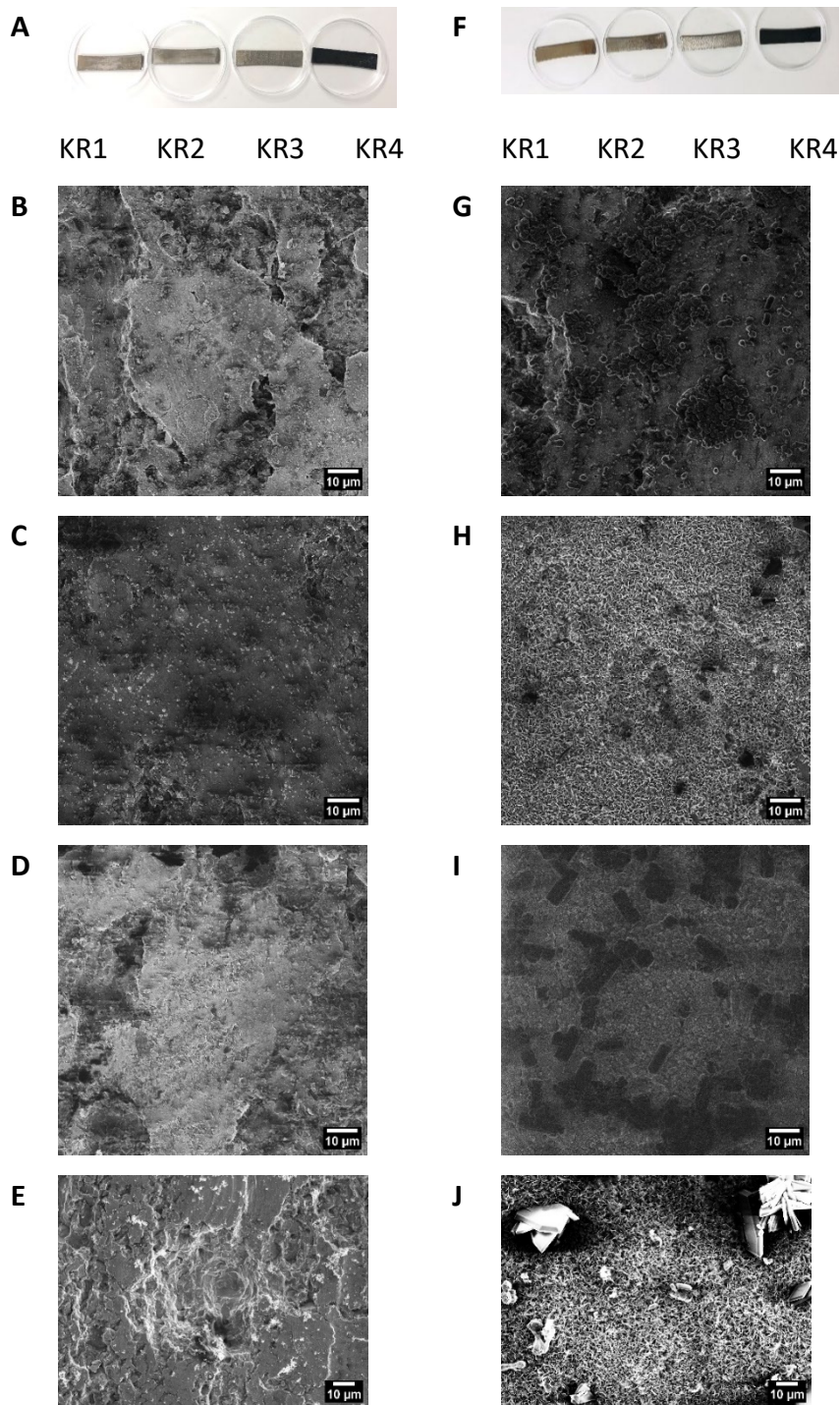


Abbildung 12 Oberflächenbeschaffenheit von Eisenprüfkörpern nach Inkubation in Soleproben ohne H₂ Atmosphäre.

Die Eisenprüfkörper (EPK) wurden 42 (A-E) und 105 (F-J) Tage in Soleproben (VR1, BG), sterilisierter Sole (VR2, CH), in sterilisierter Sole mit Sulfid (VR3, DI) und mit einer Sulfatreduzierenden Kultur (VR4, EJ) inkubiert. Die mikroskopischen, repräsentativen Aufnahmen erfolgten mittels Heliumionen- und Elektronenmikroskopie.

Auch hier zeigte VR 1 keine Veränderung innerhalb der ersten 42 Tage, danach war eine leichte Abreicherung der Gasmischung in ^2H festzustellen (100 ‰, Abbildung 13). Im Vergleich zu VR 4, in denen die Wasserstoffoxidation durch *D. halophilus* eine Veränderung von 500 ‰ erzeugt, war aber auch diese Veränderung sehr gering.

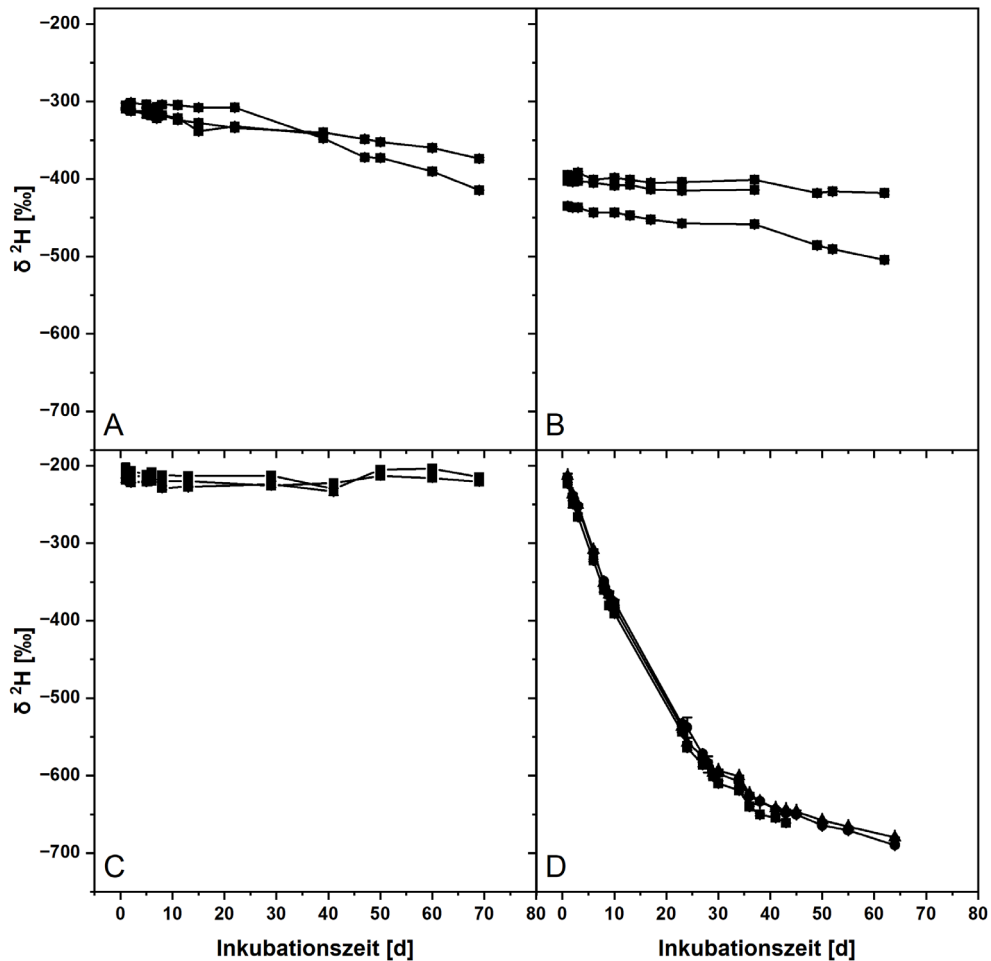


Abbildung 13 Die ^2H Isotopensignatur als Indikator für mikrobielle H_2 Oxidation

Mittels GC-IRMS wurde das H_2 Isotopensignal des Gasraums von Mikrokosmenansätzen (**A**: Kavernensole, VR 1; **B**: sterilisierte Sole, VR 2; **C**: sterilisierte Sole mit H_2S , VR 3; **D**: Kontrollansatz mit *D. halophilus*, VR 4), welche mit einem Eisenprüfkörper inkubiert wurden, über einen Zeitraum von 65 Tagen gemessen. Pro VR wurden 3 biologische Replikate angesetzt, wovon das erste bereits nach 42 Inkubationstagen für mikroskopische Analysen abgestoppt wurde. Pro Replikat wurden der Mittelwert und die Standardabweichung aus 3 Messungen gebildet.

3.3 Einfluss von Wasserstoff-Gas auf mikrobielle Aktivität auf Einzelzellebene

Die langsame Teilungsrate und geringen Stoffumsätze bei hypersalinen Bedingungen erschweren die Differenzierung zwischen mikrobieller Proliferation und Erhaltungsstoffwechsel (3.2). Daher wurde die mikrobielle Aktivität der natürlichen mikrobiellen Gemeinschaft aus den Soleproben von Cav-B und Cav-C, sowie der Anreicherungskultur MP-32 auf Einzelzellebene untersucht. Für eine Einordnung des metabolischen Potentials wurde das Metagenom von MP-32 analysiert.

3.3.1 Mikrobielle Assimilation von ^2H und ^{13}C in Soleproben

Als Nachweis für die mikrobielle Aktivität diente die intrazelluläre Inkorporation von ^2H aus Wasser und ^{13}C aus Karbonat. Dafür wurde für ^{13}C und ^2H jeweils ein Grenzwert ermittelt, der sich aus dem Schwankungsbereich der relativen Häufigkeit dieser Isotope in Zellen aus Proben ohne Tracer ergab. In diesen Zellen, die ohne Tracer inkubiert wurden, lag der Medianwert der natürlichen Häufigkeit von ^{13}C bei 1,08 At. % mit einem Schwankungsbereich bis maximal 1,20 At. %. Der Medianwert für ^2H lag bei 0,013 At. % mit einem Schwankungsbereich bis maximal 0,04 At. %.

Tabelle 20 Anteil aktiver Zellen der Soleproben in Abhängigkeit von H_2 als Elektronendonator

Die Isotopie wurde auf Einzelzellebene in drei Sichtfeldern pro Probe mittels nanoSIMS gemessen. Die zelluläre Anreicherung der Isotope ^2H bzw. ^{13}C wurde berechnet und war indikativ für eine mikrobielle Aktivität, wenn der Wert größer als 0,04 At. % bzw. 1,20 At. % war. **A- ^2H , A- ^{13}C** : relativer Anteil aktiver Zellen basierend auf der Anreicherung in ^2H und ^{13}C .

VR	Probe	Zellen	A- ^2H	A- ^{13}C
VR1	MP32 in Medium + H_2	387	98,7 %	12,9 %
KR1-1	MP32 in Medium ohne H_2	209	100,0 %	1,9 %
KR1-2	MP32 in Kavernensole Cav-B + H_2	600	80,3 %	6,2 %
VR3	Kavernensole Cav-B + H_2	415	21,7 %	3,6 %
KR3	Kavernensole Cav-B ohne H_2	185	30,3 %	0,5 %
VR4	Kavernensole Cav-C + H_2	157	29,4 %	1,6 %
KR4	Kavernensole Cav-C ohne H_2	184	67,5 %	1,3 %

Mit den jeweiligen Obergrenzen dieser Werte konnte eine Anreicherung der ^{13}C - und ^2H -Isotopie klassifiziert differenziert werden. Zellen der Anreicherungskultur MP-32, die in Medium mit Tracer inkubiert wurden, zeigten eine deutlich höhere ^2H Anreicherung in einem Bereich von 0,4 bis 1,8 At. % (Abbildung 14 A, schwarz), als die MP-32 Zellen welche in Kavernensole mit Tracer inkubiert wurden. Deren ^2H Wert war geringer als 0,4 At. %, lag aber bei 80 % der Zellen über dem Schwellenwert (Abbildung 14 A, blau; Tabelle 20).

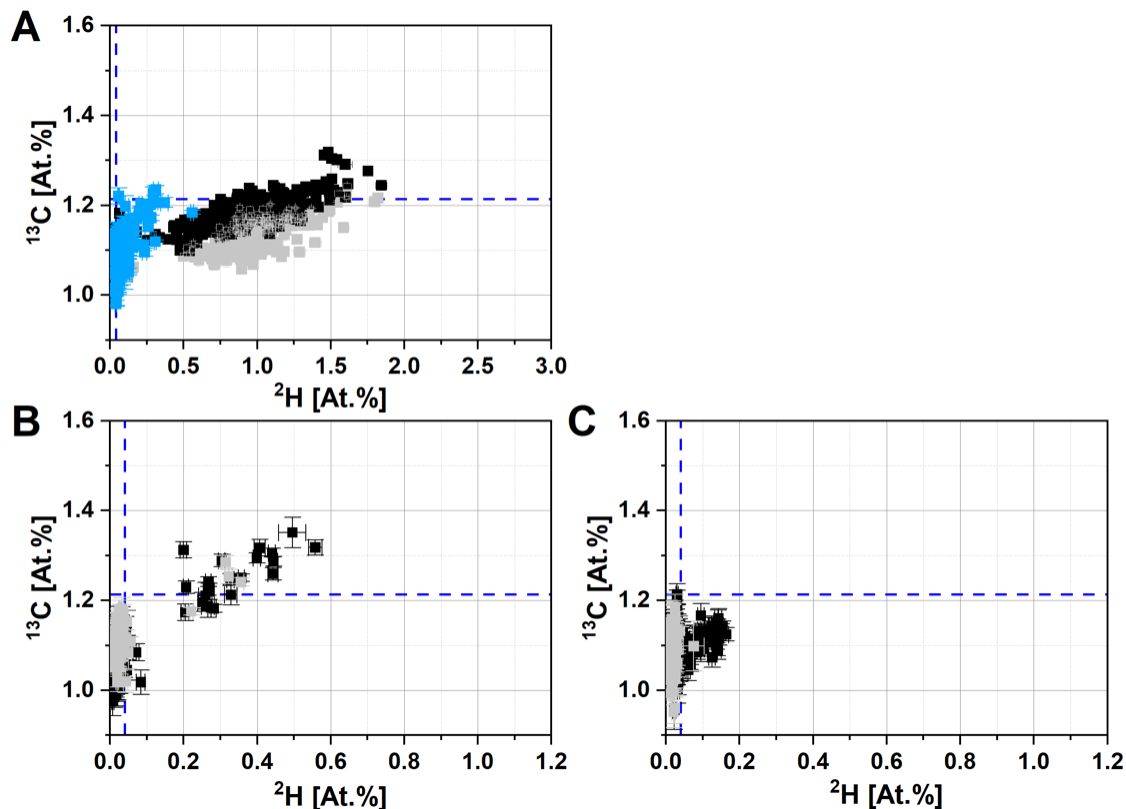


Abbildung 14 Mikrobielle Aktivität auf Einzelzellebene in Abhängigkeit von H_2 Zugabe
A: MP-32 in Medium nach Zugabe von 1,4 mM H_2 (●), in Medium ohne H_2 Zugabe (●) und in Kavernensole nach Zugabe von 1,4 mM H_2 (●). **B:** Native Soleprobe von Cav-B mit 1,4 mM H_2 (●) und ohne H_2 (●). **C:** Native Soleprobe von Cav-C mit 1,4 mM H_2 (●) und ohne H_2 (●). Die relative Häufigkeit wurde anhand der Isotopenverhältnisse in den C_2H^+ und CN^+ Ionen nach 20 Scans berechnet.

Eine Auswirkung von H_2 auf die Inkorporation von ^2H konnte nach der Inkubation von MP-32 nicht festgestellt werden (Abbildung 14 A, schwarz/grau), hatte jedoch einen Effekt auf die Inkorporation des ^{13}C -Karbonat. Bei Inkubation mit H_2 wurden in 12,9 % der Zellen, die mit ^{13}C -Karbonat inkubiert wurden, Werte gemessen, die über dem Schwellenwert lagen. Bei Inkubation mit H_2 in Sole waren es 6,2 %, während es ohne H_2 nur 1,9 % waren (Tabelle 21).

Sowohl bei der Inkubation in Sole als auch in Medium waren die Zellen, die in ^{13}C angereichert waren, ebenfalls in ^2H angereichert. Bei den Versuchen mit der natürlichen mikrobiellen Gemeinschaft von zwei verschiedenen Kavernen, Cav-B und Cav-C, waren nach der Inkubation unterschiedliche Anreicherungsmuster zu sehen. In beiden Versuchsansätzen wurden mit H_2 als Elektronendonator vermehrt Zellen mit erhöhter ^2H Isotopie detektiert. In den Versuchsansätzen mit Sole aus Cav-B waren die mikrobiellen Zellen zusätzlich mit ^{13}C angereichert (3,6 %).

3.3.2 Charakterisierung der Anreicherungskultur MP-32

Die Anreicherungskultur MP-32 proliferierte und wurde durch Vertreter der Familien *Desulfohalobiaceae* spp. und *Halanaerobiaceae* spp. dominiert (vgl. Abschnitt 3.2.1). Um diese Anreicherungskultur besser zu charakterisieren, wurde das Metagenom nach Inkubation in der Sole analysiert (Tabelle 22). Die Sequenzierung ergab nach Assemblierung, Binning und Dereplikation 8 MAGs mit ≥ 90 % Vollständigkeit. Zusätzlich zu den, mittels Amplikonsequenzierung (vgl. Abschnitt 3.2.1) identifizierten Taxa, *Desulfohalobiaceae* spp., *Halobacteroidaceae* spp., *Halanaerobiaceae* spp. und *Halomicrobioceae* spp. wurden Mitglieder der alkaliphilen *Desulfonatronovibrionaceae* sp. identifiziert.

Tabelle 21 Taxonomische Zuordnung der metagenom-assemblierten Genome

Acht Metagenom-assemblierte Genome (MAGs) mit einem Qualitätsindex ≥ 90 % wurden nach Sequenzierung des Genoms der Anreicherungskultur MP32 erhalten. C: Vollständigkeit; X: keine bzw. fehlerhafte Sequenzzuordnung auf der Basis von spezifischen Markergenen mittels CheckM.

MAG	Ordnung	Familie / Genus	C / %	X / %	Größe (bp)
1	<i>Halanaerobiales</i>	<i>Halanaerobium</i>	93,66	4,86	2.339.283
2	<i>Halanaerobiales</i>	-	90,43	3,95	2.682.889
3	<i>Desulfovibrionales</i>	<i>Desulfohalobiaceae</i>	97,92	0,60	3.301.929
4	<i>Halanaerobiales</i>	-	98,68	0,88	2.608.399
5	<i>Desulfovibrionales</i>	<i>Desulfonatronovibrionaceae</i>	100,0	0,0	2.748.332
6	<i>Desulfovibrionales</i>	<i>D. halophilus</i>	99,11	0,0	2.803.685
7	<i>Halanaerobiales</i>	<i>Halanaerobiaceae</i> (QPJE01)	96,18	0,91	2.998.839
8	<i>Halanaerobiales</i>	-	97,81	0,0	2.442.675

Es wurden zwei MAGs in der Probe identifiziert, welche sowohl Gene für CO₂-Fixierung als auch Sulfatreduktion codieren. Sie wurden dem Genus *Desulfovermiculus halophilus* (MAG 6) sowie der Familie *Desulfohalobiaceae* (MAG 3) zugeordnet. Die CO₂-Fixierung in beiden Organismen wurde aufgrund der genomischen Informationen zu Schlüsselgenen für die enzymatischen Prozesse und der Metabolite dem Wood-Ljungdahl Weg zugeordnet (Abbildung 15).

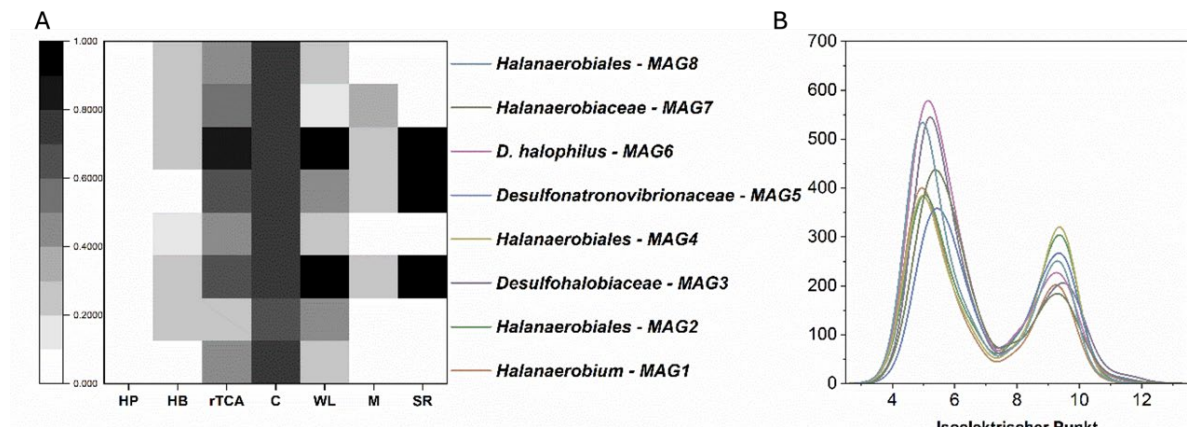


Abbildung 15 Schlüsselstoffwechselwege und Proteom-Isoelektrischer Punkt ausgewählter MAGs der Anreicherungskultur MP-32

A: Basierend auf der genomischen Annotation wurden Schlüsselgene für folgende Stoffwechselwege identifiziert. HP: Hydroxypropionat Zyklus, HB: Hydroxybutyrat Zyklus, Ca: Calvin Zyklus, WL: Wood-Ljungdahl Weg, M: Methanogenese, SR: Sulfatreduktion. Waren diese Schlüsselgene vollständig vorhanden wurde im Legendenkontext eine schwarze Farbe verwendet. Graustufen verdeutlichen das Vorhandensein von einigen Schlüsselgenen. **B:** Auf Basis der annotierten Gene wurde deren Proteinsequenz bestimmt und daraus folgend der isoelektrische Punkt der einzelnen Enzyme berechnet.

3.4 Auswirkungen von Salzgehalt und Kohlenstoffquellen auf Wachstum und Stoffwechsel unter sulfatreduzierenden Bedingungen

In allen untersuchten Salzkavernen wurden verschiedene kurzkettige Fettsäuren in geringen Konzentrationen nachgewiesen (Abschnitt 3.1.2). Da der Ursprung dieser C Quellen ungeklärt ist, kann eine Produktion durch mikrobielle Aktivität nicht ausgeschlossen werden. Um zu testen, ob diese C Quellen ihrerseits Homoacetogenese und Sulfatreduktion beeinflussen, wurde die halophile Anreicherungskultur S-FX in Medium mit niedriger, mittlerer und hoher Salzkonzentration (2,5; 3,4 und 4,4 M NaCl) und der Zugabe von den C Quellen Acetat, Laktat, Methanol kultiviert (Tabelle 22, Abbildung 16).

3.4.1 Zellproliferation, Sulfatreduktion und C1-Stoffwechsel

Bei allen Salzgehalten wurde während der Inkubationszeit von 125 Tagen ein Anstieg der Zellzahl beobachtet (Abbildung 16, AEIM). Der hohe Salzgehalt führte außerdem zu einem langsameren Anstieg von Acetat im Vergleich zu einem niedrigeren Salzgehalt ohne jegliche Zugabe von C-Substrat (Abbildung 16 O). Im Gegenzug wurde Laktat in Acetat umgewandelt (Abbildung 16 GH), und bei mittlerem und hohem Salzgehalt war keine verstärkte Korrelation zwischen Sulfatreduktion und Laktatoxidation festzustellen (Abbildung 16 FH).

Sulfatreduktion

In allen Mikrokosmen wurde Sulfat als potenzieller Elektronenakzeptor zugegeben und eine Sulfatreduktion wurde in allen niedrigen und mittleren Salzgehaltsstufen innerhalb von 125 Tagen festgestellt (Abbildung 16, BFJN). Die Geschwindigkeit der Sulfatreduktion korrelierte sowohl mit der Zellzahl, als auch mit der Art der C-Quelle (Tabelle 22). Nach einer Lag-Phase von 20 bis 60 Tagen wurde Sulfat in allen Mikrokosmen mit niedrigem Salzgehalt innerhalb von 93 Tagen vollständig verbraucht, wobei eine schnellere Sulfatreduktion mit Acetat und Methanol als C-Substrat als mit CO₂ und Laktat beobachtet wurde (Abbildung 16 BJ und FN). Ein vollständiger und schnellerer Sulfatverbrauch wurde auch bei mittlerem Salzgehalt mit Acetat und Methanol als C-Substrat erreicht. Eine unvollständige Sulfatreduktion (finale Sulfatkonzentration 2 mM und 6 mM nach 125 Tagen Inkubation), wurde bei mittlerem Salzgehalt mit CO₂ oder Laktat als C-Quelle erreicht (Abbildung 16 FN), während bei hohem Salzgehalt innerhalb von 125 Tagen keine Sulfatreduktion zu beobachten war.

Tabelle 22 Übersicht über metabolische Prozesse der Anreicherungskultur SF-X in Abhängigkeit von Salzgehalt und Kohlenstoffquelle

Der Nachweis der Stoffwechselwege erfolgte über die Konzentrationsbestimmung von Sulfat, Acetat und Methanol. (++) Stoffwechselweg war durch Substratabbau und Produktaufbau innerhalb des Versuchszeitraumes von 125 Tagen nachzuweisen; (+) Stoffwechselweg wurde nach Beendigung des Versuches (Inkubation von 1445 Tagen) nachgewiesen; (-) Stoffwechselweg wurde nicht nachgewiesen. Weitere Details zu den Proben sind unter 2.9 zu finden.

NaCl	Probe	C Quelle	Sulfatreduktion	Homoacetogenese	Methanogenese
2,5 M	S04	Acetat + CO ₂	++	++	-
2,5 M	S07	Laktat + CO ₂	++	++	-
2,5 M	S10	Methanol + CO ₂	++	++	++
2,5 M	S13	CO ₂	++	++	-
3,4 M	S05	Acetat + CO ₂	++	++	-
3,4 M	S08	Laktat + CO ₂	++	++	-
3,4 M	S11	Methanol + CO ₂	++	++	++
3,4 M	S14	CO ₂	++	++	-
4,4 M	S06	Acetat + CO ₂	+	++	-
4,4 M	S09	Laktat + CO ₂	+	++	-
4,4 M	S12	Methanol + CO ₂	+	++	-
4,4 M	S15	CO ₂	-	++	-

Nach insgesamt 1445 Tagen war Sulfat jedoch in den Versuchsanordnungen mit hohem Salzgehalt und entweder Acetat, Laktat oder Methanol als C-Quelle vollständig verbraucht (Tabelle 22; S6, S9, S12). In S15, mit CO₂ als einziger C-Quelle und hohem Salzgehalt, war die Sulfatkonzentration nach 1445 Tagen unverändert.

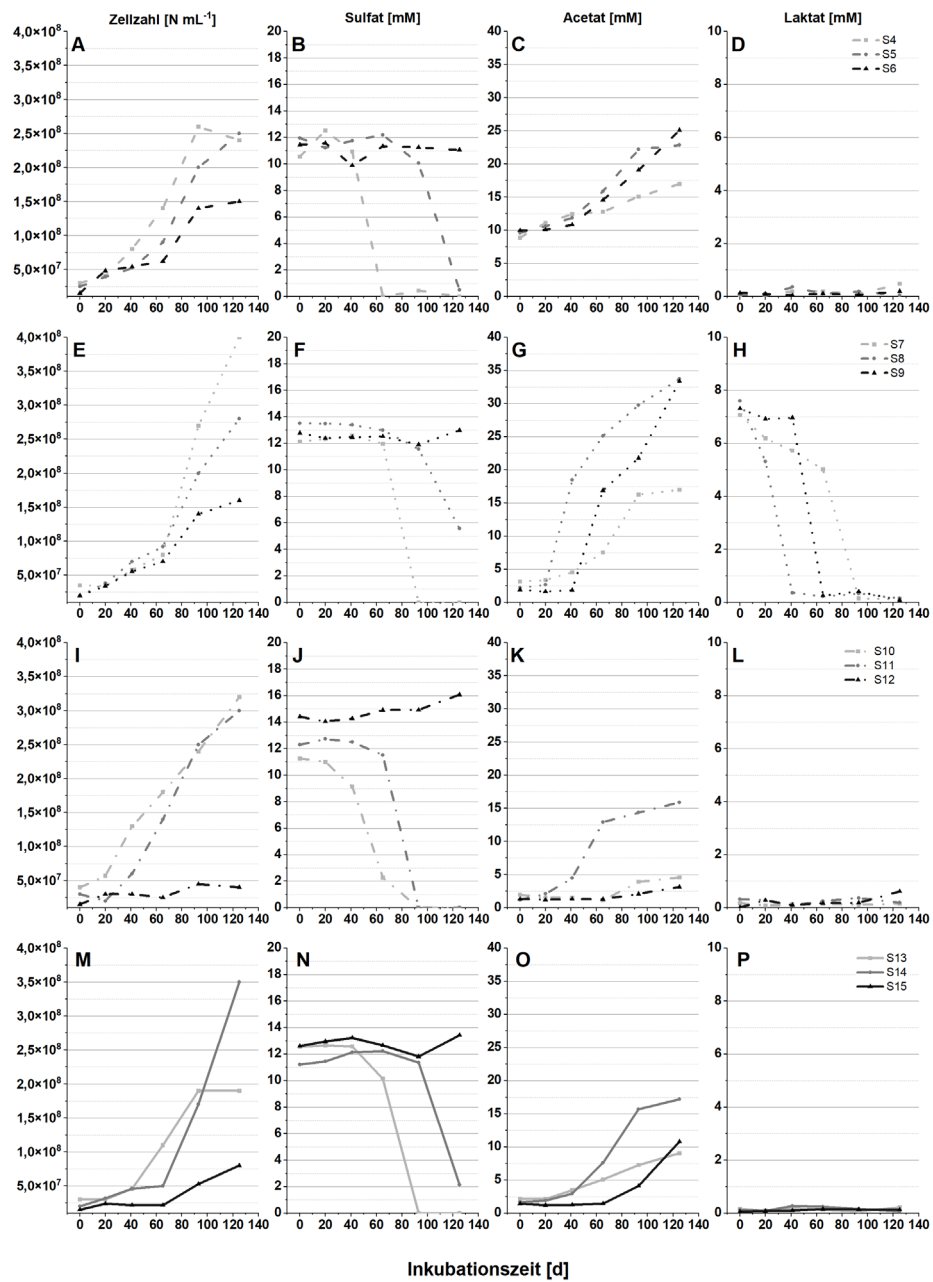


Abbildung 16 Proliferation der Anreicherungskultur SF-X in Abhängigkeit zur Salzkonzentration

Zellzahl (A, E, I, M), sowie Sulfat- (B, F, J, N), Acetat- (C, G, K, O) und Laktatkonzentrationen (D, H, L, P) in Mikrokosmenansätzen mit der Anreicherungskultur SF-X bei drei Salzgehalten (2,6 M NaCl, hellgrau; 3,4 M NaCl, grau; und 4,4 M NaCl, schwarz) und mit entweder Acetat (A, B, C, D, Strich), Laktat (E, F, G, H, Punkt), Methanol (I, J, K, L, Strich-Punkt) oder keiner C-Quelle (M, N, O, P, gerade) und einer H₂:CO₂-Gasphase (8:2).

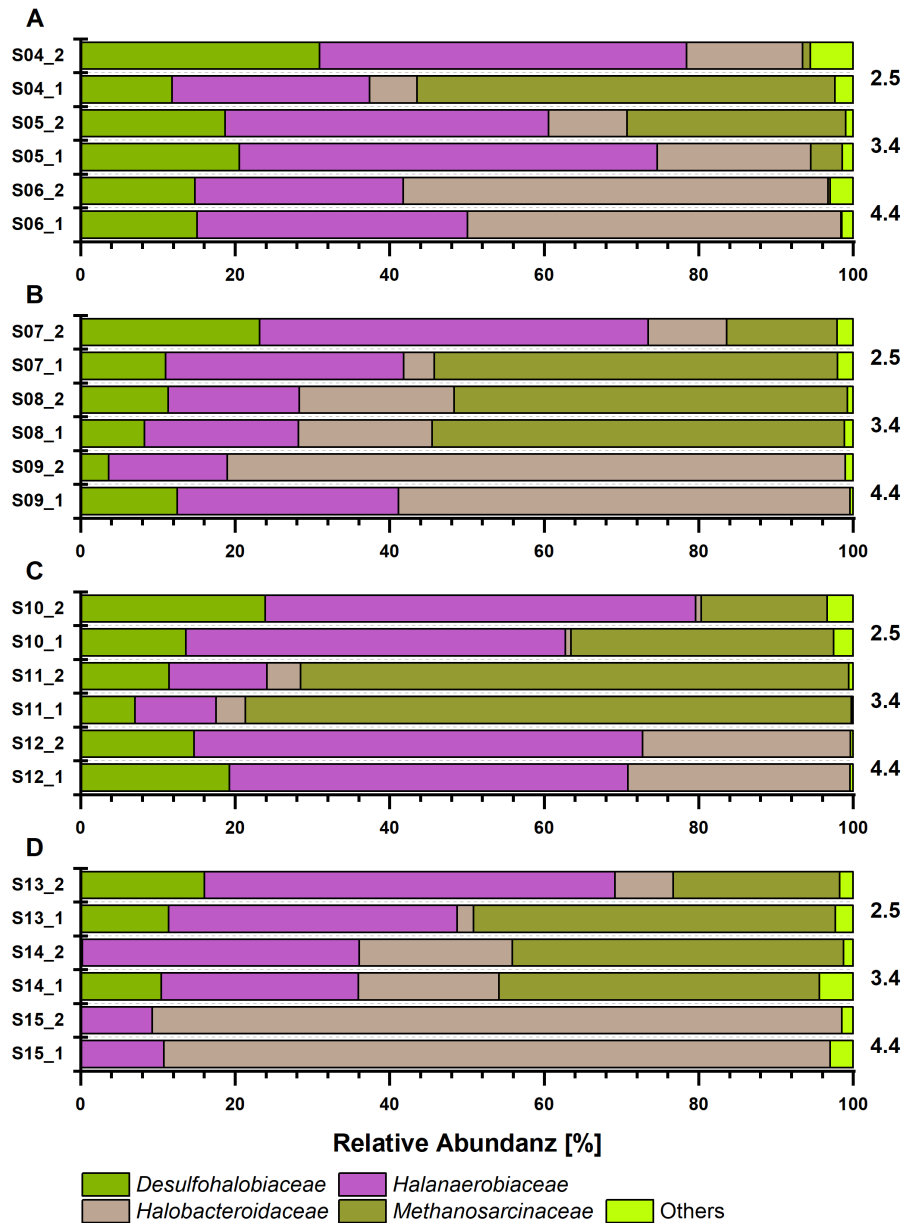


Abbildung 17 Mikrobielle Diversität der Anreicherungskultur SF-X in Abhängigkeit zur Salzkonzentration

Relative Abundanz der vier dominierenden mikrobiellen Taxa in 12 Mikrokosmenansätzen nach einer Inkubationszeit von 125 Tagen. Für die spezifische Amplifikation wurden zwei verschiedene Primersets, für die variable V3 V4 Region des bakteriellen (341F/785R, Klindworth *et al.* 2013) und die variable V3 V5 Region des archaeellen 16S rRNA Gens (340F/1000R, Gantner *et al.* 2011, Sundberg *et al.* 2013) verwendet. Die Verwertung von verschiedenen Kohlenstoffquellen wurde unter sulfatreduzierenden Bedingungen mit H₂-Gas bei verschiedenen Salzgehalten getestet. **A:** CO₂ + Acetat. **B:** CO₂ + Laktat. **C:** CO₂ + Methanol. **D:** CO₂. **2.5:** 2,5 M NaCl. **3.4:** 3,4 M NaCl. **4.4:** 4,4 M NaCl. *Others* = Andere. Abbildung aus Schwab *et al.* (2023).

Effekt der C-Quellen

Die Acetatproduktion aus CO₂ wurde bei niedrigem und mittlerem Salzgehalt beobachtet (Abbildung 16 O), was auf eine acetogene Aktivität hinweist. Außerdem reicherte sich Acetat bei niedrigem und mittlerem Salzgehalt an, was darauf hindeutet, dass die Acetogenese schneller ablief als der Verbrauch von Acetat durch andere Mikroorganismen in der Gemeinschaft. Ebenso wurde Acetat bei hohem Salzgehalt produziert, jedoch ohne Sulfatreduktion (Abbildung 16 NO). Acetat wurde voraussichtlich auch aus Laktat hergestellt und die Daten zeigen, dass Laktat bei mittlerem und hohem Salzgehalt vor der Sulfatreduktion zu Acetat oxidiert wurde, während bei niedrigem Salzgehalt die Laktatoxidation mit der Sulfatreduktion einherging (Abbildung 16 FGH). Methan wurde bei niedrigem und mittlerem Salzgehalt ausschließlich aus Methanol hergestellt (Abbildung 18 K).

Mikrobielle Proliferation und Gemeinschaftsstruktur

Die Zellzahl nahm bei allen Salzgehaltsstufen im Laufe der Zeit zu und die Amplikonsequenzierungsdaten zeigen, dass Mitglieder der Klasse *Halanaerobiiia* die höchsten Sequenzabundanzen aufwiesen (Abbildung 17) und sowohl *Halanaerobiaceae*, als auch *Halobacteroidaceae*, wurden bei allen Salzgehaltsstufen gefunden. Dementsprechend konnten insgesamt 6 MAGs nach Metagenomsequenzierung der Ordnung *Halanaerobiales* zugeordnet werden (Tabelle 22). Die Zellzahlen reichten von 1,9 bis 4,0·10⁸ Zellen mL⁻¹ bei niedrigem Salzgehalt, wobei Laktat und Methanol die Zellvermehrung am stärksten förderten. Wie bei langsam wachsenden Mikroorganismen zu erwarten, wurde die stationäre Phase mit diesen C-Quellen während der Inkubationszeit von 125 Tagen nicht erreicht (Abbildung 16, AEIM). Die Zellzahlen bei mittlerem Salzgehalt schwankten weniger stark und lagen zwischen 2,5 und 3,5·10⁸ Zellen mL⁻¹. Die stationäre Phase wurde nach 125 Tagen Inkubation nicht erreicht. Bei niedrigem und mittlerem Salzgehalt trugen halophile Archaeen der Familie *Methanosarcinaceae* weitgehend zur Sequenzlesehäufigkeit bei, was auf eine hohe Zellzahl hinweist. Bei hohem Salzgehalt förderten Acetat und Laktat eindeutig die Vermehrung, im Gegensatz zum gleichen Salzgehalt mit den C-Substraten Methanol und CO₂ (Abbildung 16, AEIM). Mitglieder der Gattung *Desulfohalobiaceae* waren in allen Salzgehaltsstufen vorhanden, außer bei hohem Salzgehalt und CO₂ als C-Substrat. Die Anwesenheit von *Desulfohalobiaceae* wurde bei der Metagenom-Sequenzierung nicht festgestellt. Stattdessen wurden SRB, die zur Familie der *Desulfonatrovibirionaceae* sp. gehören, identifiziert (Abbildung 19, Tabelle 23).

3.4.2 Abschätzung der mikrobiellen Stoffwechselleistungen

Für eine genauere taxonomische Zuordnung und um einen Überblick über das metabolische Potential dieser Spezies zu erhalten, wurde das Metagenom einzelner Proben (S11, S12, S14, S15) analysiert. Insgesamt wurden 9 Genome (engl. „metagenome assembled genome“, MAG) mit einer Vollständigkeit von mehr als 80 % und einer Fehlerrate von weniger als 5 % erhalten (Tabelle 24).

Tabelle 23 Taxonomische Zuordnung der SF-X-Mags

Neun Metagenom-assemblierte Genome (MAGs) wurde nach der Sequenzierung von S11, S12 und S14 und S15 und Auswertung über die Metawrap Pipeline erhalten. Dabei wurden nur MAG mit einer Vollständigkeit (C) von mehr als 80 % und einer Fehlerrate (X) von weniger als 5 % zugelassen. Die taxonomische Zuordnung erfolgte über GTDB.

MAG	Ordnung	Familie / Genus	C	X	Größe (bp)
1	<i>Halanaerobiales</i>	-	97,8	0	3.014.501
2	<i>Halobacteroidales</i>	<i>Acetohalobium</i>	97,41	0,86	2.325.266
3	<i>Halanaerobiales</i>	-	95,61	0,88	2.821.930
4	<i>Halanaerobiales</i>	-	94,29	2,19	2.218.693
5	<i>Methanosarcinales</i>	<i>Methanohalophilus</i>	93,62	0	2.767.598
6	<i>Halanaerobiales</i>	<i>Halanaerobium</i>	92,17	3,33	1.613.526
7	<i>Desulfovibrionales</i>	<i>Desulfonatronovibrionaceae</i>	91,07	0	2.311.446
8	<i>Halanaerobiales</i>	<i>Halanaerobiaceae</i> (QPJE01)	90,74	0	2.052.024
9	<i>Halanaerobiales</i>	<i>Halanaerobium</i>	80,16	3,70	2.391.315

Die größte Vollständigkeit (> 97 %) wiesen zwei MAGs auf, die den *Halanaerobiales* und *Halobacteroidales* (*Acetohalobium*) zugeordnet wurden. Eine taxonomische Zuordnung auf Familienebene war für den Vertreter der *Halanaerobiales*, sowie für zwei weitere MAGs, nicht möglich. Es zeigte sich aber, dass alle drei MAGs nah miteinander verwandt sind und sich phylogenetisch zwischen den *Halanaerobiales* und *Halobacteroidales* einordnen lassen (Abbildung 19). Von den verbleibenden 5 MAGs, war ein MAG den *Desulfovibrionales* (*Desulfonatronovibrionaceae*) zuzuordnen, eines den *Methanosarcinales* (*Methanohalophilus euhalobius*) und zwei gehörtem den Genus *Halanaerobium* an.

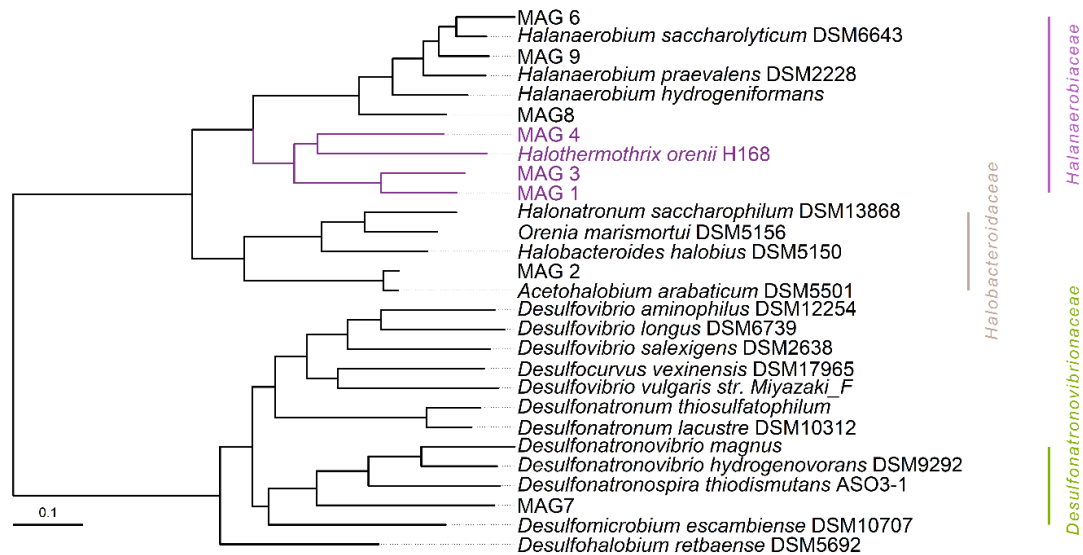


Abbildung 19 Phylogenetische Zuordnung ausgewählter MAGs der Anreicherungskultur SF-X

Die phylogenetische Berechnung basiert auf 49 universellen Genen aus dem Cluster orthologischer Gruppen. Für das multiple Sequenzalignment wurde der fasttree2-Algorithmus verwendet, welcher die maximum-likelihood Methode und den Austausch der nächsten Nachbarn kombiniert.

Zusätzlich zur phylogenetischen Einordnung, wurden die Genome der MAGs mit DRAM annotiert, um die Stoffwechselwege für den Kohlenstoff-Metabolismus und die Energiegewinnung zu untersuchen (Abbildung 20 A). Nach der Annotation wurde der isoelektrische Punkt (pI) der gefundenen Proteine bestimmt, um so einen indirekten Hinweis auf die mögliche Osmoadaptionsstrategie der Mikroorganismen zu erhalten.

Die Daten zeigen einen fast vollständig codierten WLP in MAG 2, was die Acetatbildung in den Mikrokosmen nach taxonomischer Zuordnung von MAG 2 auf *Acetohalobium* sp. zurückführen lässt (Abbildung 19). Die Methanogenese, welche nur in den Mikrokosmen S10 und S11 stattfand, war durch den entsprechenden Stoffwechselweg in MAG 5 dem Archaeum *Methanohalophilus euhalobius* zuzuordnen. Diese Spezies war darüber hinaus in allen anderen Mikrokosmen mit niedriger und mittlerer Salzkonzentration abundant, Methan wurde jedoch nur in den Ansätzen mit Methanol gebildet. In MAG 7 wiederum, welches aufgrund des Vorhandenseins des dissimilatorischen Sulfatreduktionsweges als Genom des SRB identifiziert wurde, wurde weder der WLP, noch eine Laktatdehydrogenase nachgewiesen (Anhang 8.3), was mit der Feststellung übereinstimmt, dass das Vorhandensein von Laktat die Sulfatreduktionsrate nicht erhöhte (Abbildung 16 FH). Die Verteilung des

Protein pI dieser Spezies zeigte auch einen größeren Anteil saurer Proteine. Auffallend war, dass der Anteil basischer Proteine geringer war als bei den anderen Spezies. Sulfatverbrauch wurde innerhalb des Versuchszeitraumes von 128 Tagen in allen Mikrokosmen mit niedrigem und mittlerem Salzgehalt gemessen, jedoch nicht in den Ansätzen mit hohem Salzgehalt. In diesen war Sulfat jedoch in den Ansätzen mit Acetat, Laktat und Methanol nach 1423 Tagen verbraucht, was mit der relativen Abundanz des Sulfatreduzierers einherging. Das entsprechende MAG 7 wurde den *Desulfonatronovibrionaceae* zugeordnet. Diese Familie beinhaltet derzeit zwei Spezies, *Desulfonatronovibrio* und *Desulfonatronospira*.

Die MAGs 1, 3 und 4, welche keiner Familie zugeordnet werden konnten, zeichneten sich durch einen unvollständig vorhandenen Hydroxypropionat-hydroxybutyrat Zyklus aus, der in den anderen MAGs nicht nachgewiesen werden konnte.

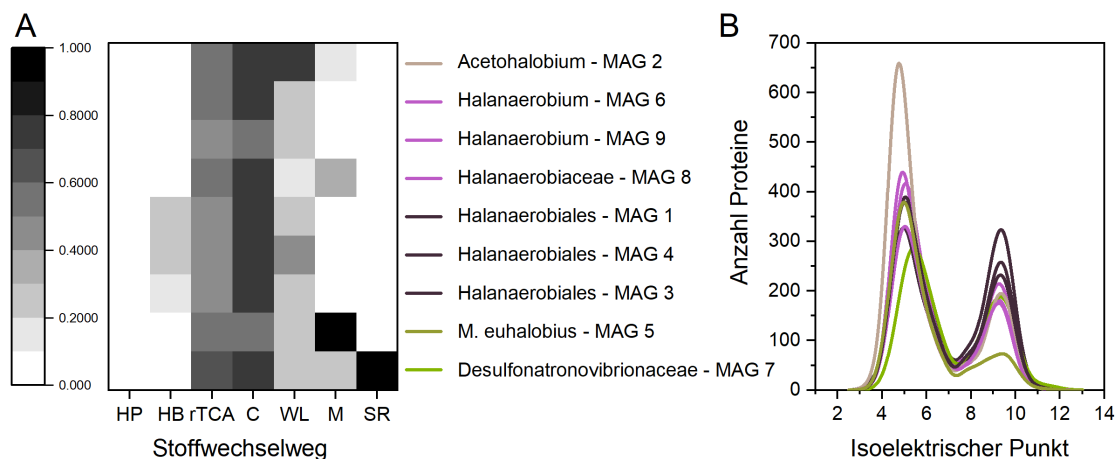


Abbildung 20 Schlüsselstoffwechselwege und Proteom-Isoelektrischer Punkt ausgewählter MAGs der Anreicherungskultur SF-X

A: Basierend auf der genomischen Annotation wurden Schlüsselgene für folgende Stoffwechselwege identifiziert. Waren diese Schlüsselgene vollständig vorhanden wurde im Legendenkontext eine schwarze Farbe verwendet. Graustufungen verdeutlichen das Vorhandensein von einigen Schlüsselgenen. HP: Hydroxypropionat Zyklus, HB: Hydroxybutyrat Zyklus, rTCA: reduktiver Citratcyclus, C: Calvin Zyklus, WL: Wood-Ljungdahl Weg, M: Methanogenese, SR: Sulfatreduktion. **B:** Auf Basis der annotierten Gene wurde deren Proteinsequenz bestimmt und daraus folgend der isoelektrische Punkt der einzelnen Enzyme.

4 Diskussion

Der Untergrund im Allgemeinen und insbesondere die tiefe Biosphäre, die mindestens 1 m unter der Oberfläche beginnt, gilt als der größte mikrobielle Lebensraum der Erde (Edwards et al. 2012). Erste Versuche die Zahl der mikrobiellen Zellen zu quantifizieren und zu extrapolieren, ergaben $3,8 \times 10^{30}$ Zellen im Untergrund (Whitman et al. 1998), während neuere Daten auf 2 bis 6×10^{29} Zellen hindeuten und dass die Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaft je nach Lithologie variiert (Magnabosco et al. 2018). Im Untergrund können Mikroorganismen planktonisch in Bruchflüssigkeiten, Grundwasser oder Solen leben oder sich an die umgebende Gesteinsformation anheften. Untersuchungen und Probenahmen sind auf Standorte beschränkt, die Zugang zum tiefen Untergrund haben, entweder durch Bohrungen zu wissenschaftlichen Zwecken, wie zum Beispiel die finnischen Standorte Olkiluoto und Outokumpu (Bomberg et al. 2015, Itävaara et al. 2011), das Hainich Critical Zone Exploratory (Kohlhepp et al. 2017), das kanadische Groundwater Observation Well Network GOWN in Alberta (Humez et al. 2016) und die Off-Shore-Bohrungen im Guyamas Basin, Kalifornien (Teske et al. 2021) oder der Zugang über Stollen und Bergwerke wie das Schweizer Bedretto Lab (Acciardo, A. et al. 2021), das schwedische Äspö Hard Rock Laboratory (Mehrshad et al. 2021), die Sanford Underground Research Facility (Osburn et al. 2014) und die südafrikanische Tau Tona Goldmine (Magnabosco et al. 2016). Die mikrobielle Aktivität in diesen Systemen wurde mit Hilfe von Metatranskriptom- und Metaproteomanalysen untersucht, wobei durch *in-situ*-Inkubationsexperimente der Verbrauch von Elektronendonoren und -akzeptoren wie Sulfat, Karbonat und Wasserstoff sowie die Produktion von Metaboliten analysiert wurden. Diese Studien erfordern jedoch entweder große Mengen an Probenmaterial (Lopez-Fernandez et al. 2018a, Lopez-Fernandez et al. 2018b, Bagnoud et al. 2016), kontinuierlichen Zugang zum Feld, um Veränderungen in der mikrobiellen Zusammensetzung zu überwachen (Bagnoud et al. 2016) oder den Einsatz von In-situ-Probenahmegeräten (Pedersen 2013). Wenn der Zugang zur Probenahmestelle und das Probenahmenvolumen begrenzt sind, wie dies zum Beispiel bei Offshore-Bohrlöchern der Fall ist, sind Inkubationen mit stabilen Isotopen zur Verfolgung der mikrobiellen Aktivität eine mögliche Lösung für limitierten Probenmengen mit geringen Zellzahlen (Meyer et al. 2024).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden fünf Erdgaskavernenspeicher beprobt, die in Zukunft als potenzielle Wasserstoffspeicher dienen sollen. Die Umstellung von Erdgas auf Wasserstoff verändert das Substrat für das Solemikrobiom. Mit Wasserstoff als Elektronendonator können verschiedene anaerobe Stoffwechselwege ablaufen, von denen manche mit negativen Auswirkungen und Risiken auf den Speicherstandort, die Speichersicherheit und die Arbeitssicherheit verbunden sind (Dopffel et al. 2021). Diese sind mikrobiell induzierte Korrosion durch Sulfatreduktion und Eisenoxidation sowie Wasserstoff-Gaszehung durch CO₂-Reduktion zu Acetat oder Methan, sowie Sulfatreduktion. Die Vergleichsmöglichkeiten mit anderen Kavernenstudien sind limitiert, daher wurde zunächst der Ist-Zustand der Kavernen charakterisiert. In allen fünf Kavernen wurden Mikroorganismen in der Sole des Kavernensumpfes nachgewiesen und über Amplikonsequenzierung taxonomisch zugeordnet. Des Weiteren wurde die Hydrochemie der Sole im Kavernensumpf analysiert. Hier zeigte sich, dass neben einem hohen anorganischen Kohlenstoffgehalt auch verschiedene andere kurzkettige Fettsäuren in variierenden Konzentrationen in den Soleproben vorhanden waren. Da der Eintrag dieser Kohlenstoffquellen keinen anderweitig erklärbaren Grund hat, besteht die Möglichkeit, dass sie durch mikrobielle Primärproduktion und Fermentation entstanden sind. Diese Ergebnisse sind in Abschnitt 4.1 diskutiert.

In den Soleproben der Kavernen wurde weder ein Sulfatverbrauch, Wasserstoffoxidation noch MIC nachgewiesen. Es erwies sich jedoch, dass die Mikroorganismen der Anreicherungskultur MP-32 in der Sole proliferieren und der halophile Modellorganismus *D. halophilus* zu MIC auf EPK führt. Das Ausmaß mikrobieller Sulfidogenese und deren Auswirkungen auf Eisen werden Abschnitt 4.2 diskutiert.

Um die mitunter lange Kultivierungsdauer zu umgehen, wurde mikrobielle Aktivität zusätzlich auf Einzelzellebene untersucht und eine Methode zur Messung der Akkumulation von H- und C-Isotopen für ein kommerzielles nanoSIMS Cameca 50L Gerät entwickelt. In den Zellen der Anreicherungskultur MP-32 und der Soleproben konnte so eine unterschiedlich starke Inkorporation von Isotopen in die Biomasse beobachtet werden, welche in Abschnitt 4.3 interpretiert wird.

Zusätzlich wurden autotrophe Prozesse bei verschiedenen Salzgehalten unter sulfatreduzierenden Bedingungen, mit Wasserstoff als einziger Energiequelle untersucht. Mikrobielles Wachstum und Acetatproduktion einer Anreicherungskultur (SF-X) wurden

durch die steigenden Salzkonzentrationen zwar verlangsamt, aber nicht inhibiert. Die Ergebnisse weisen in ihrer Gesamtheit darauf hin, dass mikrobielle Prozesse bei Salzsättigung langsam ablaufen und sich zuweilen zeitlich limitierten Laborexperimenten entziehen.

Im Folgenden werden zunächst die Kavernenparameter und das gefundene Nährstoffangebot diskutiert und das Habitat Salzkaverne als möglicher mikrobiologischer Lebensraum diskutiert (Abschnitt 4.1). Darauf aufbauend, mikrobielle Aktivität in der Kavernensole mit Wasserstoff als Elektronendonator (Abschnitt 4.2). Außerdem wird die Performance von *Acetohalobium* und den anderen Mitgliedern der halophilen Anreicherungskultur (SF-X) unter autotrophen und nicht autotrophen Bedingungen diskutiert, um die Risiken abzuschätzen, die eine Anreicherung von *Acetohalobium* in Salzkavernen hätte (Abschnitt 4.3).

4.1 Erdgaskavernen als mikrobielles Habitat

Die Beprobung der Salzkavernen war ein zentraler Punkt dieser Arbeit. In Anbetracht der Tatsache, dass die Tiefe der Sole weder bekannt war noch vorhergesagt werden konnte und keine Daten zu einer mikrobiellen Gemeinschaftsstruktur bestanden, ist die geglückte Probenahme, DNA-Extraktion und -Amplifikation ein Erfolg. Über die mikrobielle Gemeinschaft und deren Hydrochemie in Salzkavernen aus der Zechsteinformation lagen zu Beginn dieser Arbeit keine Daten vor. Bedingt durch die Geometrie der Kaverne und dem Zugang durch ausschließlich ein einziges Bohrloch, konnte nur ein begrenzter Ausschnitt der Kaverne beprobt werden. Dies limitiert die Aussagekraft der Ergebnisse, da weder die Kavernenwand noch der Grund des Sumpfes beprobt wurden, sondern sich alle Ergebnisse auf das Zentrum des Sumpfes in bis zu 4 m Tiefe beziehen.

Kavernenparameter & Hydrochemie

Bei der Probenahme am Kavernenfeld wurden in den Soleproben der Kavernensümpfe pH-Werte von 6,0 bis 6,5 gemessen. Diese waren geringer als jene, die in den Soleproben von Bordenave et al. (2013) beschrieben wurden und zwischen 6,6 und 7,0 lagen. Ob dies den tatsächlichen pH-Wert in der Kaverne widerspiegelt, ist unklar. Dieser wird im Kavernensumpf im Wesentlichen von in Lösung gehenden Karbonationen (CO_3^{2-}) beeinflusst, die sich ihrerseits auf die Konzentrationen von HCO_3^- und H_2CO_3 auswirken. Der Probennehmer wurde über einen längeren Zeitraum schrittweise an Atmosphärendruck angepasst, dabei und während des Abfüllens, könnten die gelösten HCO_3^- -Ionen über das $\text{CO}_2 \leftrightarrow \text{HCO}_3^-$

Gleichgewicht entwichen sein. Was mit einem Anstieg des pH-Wertes einherginge. Man kann also annehmen, dass der pH-Wert der Sole maximal dem gemessenen Wert entspricht, aber wahrscheinlich niedriger liegt. Der hohe Salzgehalt war erwartungsgemäß bei einer Konzentration von 4,7 M NaCl (bei 26,4 °C) und somit unterhalb der Salzkonzentrationen, die sich in Salzseen und Unterwasser-Solebecken einstellen (Pérez und Chebude 2017; Yakimov et al. 2007). Die Kalium-Konzentration in den Soleproben war mit 1,3 mM 1.000-fach geringer als die Natrium-Konzentration und kann sich so limitierend auf das Wachstum von Halophilen auswirken, die den osmotischen Druck mit der *salt-in* Strategie ausgleichen (Tabelle 24). Viele *Halobacteria* und *Halanaerobiales* akkumulieren bis zu 2 M Kalium, um die extrazelluläre Natriumkonzentration zu kompensieren (Gunde-Cimerman et al. 2018). Die Akkumulation ist auch dann möglich, wenn der Konzentrationsunterschied zwischen Kalium- und Natriumionen ein 100-faches beträgt (Oren 2006). Mit Versuchen an *Halobacterium halobium* wurde bestätigt, dass Kaliumkonzentrationen ab 1 mM Wachstum unterstützten, bis alles Kalium in den Zellen gebunden war (Gochnauer und Kushner 1971). Die Sulfatkonzentrationen waren wie erwartet hoch und lagen über den Sulfatkonzentrationen von ungefähr 29 mM im Ozean (Jørgensen und Kasten 2006). Während die Komponenten mineralischen Ursprunges (Na⁺, Cl⁻, K⁺, SO₄²⁻) in allen Salzkavernen in ähnlichen Konzentrationen vorlagen, schwankten die Konzentrationen von C Quellen und anderen Ionen.

Tabelle 24 Osmoadaptionsstrategien des zentralen Kavernenmikrobioms

Familie	Osmoadaptionsstrategie	Ökophysiologie
<i>Halomicrobiaceae</i>	<i>salt-in</i> , K ⁺ , Cl ⁻ und Na ⁺	Moderat bis extrem halophil in
<i>Halobacteriaceae</i>	<i>Heterotroph, phototroph</i>	Salzseen, Salzgewinnungsstätten
<i>Halobacteroidaceae</i>	<i>salt-in</i> , K ⁺ , Cl ⁻ und Na ⁺	Moderat halophil, in anaeroben
<i>Halanaerobiaceae</i>	Fermentation, Acetogenese	Sedimenten von Salzseen
<i>Desulfohalobiaceae</i>	<i>salt-out</i> , Trehalose, Glycinbetain, Hetero-/Autotrophe	Leicht bis extrem halophil in anaeroben Sedimenten von Salzseen
<i>Balneolaceae</i>	-	Halotolerant, fakultativ anaerob, in Salzgewinnungsstätten

Als mikrobiell verwertbare C Quellen waren TIC, Formiat, Acetat, Laktat, Propionat und Butyrat in allen Kavernen vorhanden (siehe Tabelle 24 für die Konzentrationen in den jeweiligen Kavernen). Ob Teile des DOC bioverfügbar waren, ist unklar. Kohlenwasserstoffe und Glycole, welche als Trennschicht zwischen Sole und Speichergas eingesetzt werden, können ebenfalls als C Quelle dienen. Des Weiteren wurden in allen Kavernen Alkohole (Methanol, Ethanol und Isopropanol) nachgewiesen, die in Mitteln zur Instandhaltung der Kaverneninfrastruktur eingesetzt werden. Anorganischer Kohlenstoff ist in Form von Karbonaten Teil des umgebenden Salzgesteins, und somit nicht limitierend. Über verschiedene Wege kann die autotrophe Fixierung von Kohlenstoff bzw. Karbonaten erfolgen, wenn genügend Energiequellen bereitstehen (Lemaire et al. 2020; Berg et al. 2010). Mehrere Studien zeigen, dass in salinen Systemen hauptsächlich die energieeffizientere, methylotrophe oder acetoklastische Methanogenese aus Formiat, Acetat und methylierten Verbindungen stattfindet und nicht durch autotrophe CO₂-Fixierung (Oren 1999). Extrem halophile Methanogene, mit einem Na⁺-Optimum bei 4 M, wurden bereits aus Sodaseen isoliert (Sorokin et al. 2017a). Weitere wurden aus diesen Habitaten mit hoher Salzkonzentration gewonnen und bei geringeren Salzkonzentrationen angereichert (Sorokin et al. 2015a). Methylotrophe Methanogenese wurde außerdem für *Methanomicrobia*, in Sedimenten mit einer Salinität von 4,6 M nachgewiesen (Zhuang et al. 2016). In Mikrokosmen wurde gleichzeitig methanogene und sulfidogene Aktivität bei einer Salinität von 10 % beschrieben (Cadena et al., 2018). Hier wird deutlich, dass halophile Methanogene zwar bei hohen Salzkonzentrationen überdauern können, Methanogenese aber bei niedrigeren Salzkonzentrationen abläuft. Für das Vorhandensein von Acetat, Laktat, Formiat und Butyrat konnte keine externe Quelle bestimmt werden und man kann annehmen, dass dieses mikrobiellen Ursprungs sind, mit dem Solungsmedium eingetragen wurden oder ebenfalls aus dem Salzgestein gelöst wurden. Acetat, Formiat und Propionat wurden in sehr geringen Mengen, 2 bis 20 µg g⁻¹, in Halit nachgewiesen (Fernández-Remolar et al. 2013). Für den Fall, dass sie mikrobiellen Ursprungs sind, können diese Substrate durch Fermentation oder Acetogenese entstanden sein. In hypersalinen Habitaten werden gewöhnlich Osmolyte fermentiert, die von anderen Mikroorganismen synthetisiert wurden um den osmotischen Druck mittels *salt-out* Strategie zu regulieren (Oren 2014). Butyrat wurde in allen Kavernen nachgewiesen und entsteht bei der Fermentation von Polysacchariden. Für die Fermentation kommen besonders halophile Vertreter der *Firmicutes*, die *Halanaerobiales*, in Frage

(Abdeljabbar et al. 2013). Gleichzeitig dienen die kurzkettigen Fettsäuren und Ethanol als Energiequelle für SRBs (Rabus et al. 2015). In Kohlenwasserstoff-kontaminierten Grundwasserleitern wurde die Akkumulation von kurzkettigen Fettsäuren (Butyrat bis zu 28 mM) durch mikrobielle Abbauprozesse untersucht und festgestellt, dass diese unter Sulfat-reduzierenden Bedingungen verbraucht wurden (Van Stempvoort et al. 2009). Der Einfluss von verschiedenen SCFAs, H₂ und Glucose wurde in haloalkalinen Systemen (175 g L⁻¹ Na⁺) untersucht (Sorokin et al. 2010a). Glucose und Formiat waren bevorzugte C Quellen für SRBs und die SRR war mit diesen Substraten am höchsten. Dies könnte die geringen Konzentrationen der SCFAs in den Kavernen erklären. In salinen Systemen wurden SRBs, welche mit SCFAs Sulfat reduzieren, in den phylogenetischen Gruppen der *Desulfobacterales* und *Desulfovibrionales* gefunden (Zhilina 1997; Sorokin et al. 2008). Vertreter der letzten Gruppe (*Desulfovibrionales-Desulfohalobiaceae*) konnte in den Soleproben der Kavernensümpfe nachgewiesen werden.

Stickstoff und Phosphor sind weitere essenzielle Elemente für mikrobielle Proliferation und wurden in Form von Ammonium und Phosphat in manchen Kavernen nachgewiesen (Tabelle 24). Während Phosphat in Spuren Bestandteil der Evaporitminerale ist, kann Ammonium durch den Abbau von Aminosäuren entstanden sein (Baliga et al. 2004).

Mikrobielle Gemeinschaft

Anhand der Geochemie des Salzgesteins und der, durch die aphotischen Bedingungen limitierten Primärproduktion, waren autotrophe Extremophile zu erwarten. Es stellte sich jedoch heraus, dass die Kavernensole von halophilen Mikroorganismen verschiedener ökophysiologischer Nischen besiedelt war. Die Zellzahl ($2-7 \times 10^6$) ist vergleichbar mit anderen anaeroben, subterranean Habitaten wie Aquiferen, die zur Gasspeicherung dienen und deren Zellzahlen im Bereich von 2×10^4 bis 5×10^6 lagen (Ranchou-Peyruse et al. 2021; Morozova et al. 2013). Mikroorganismen und mikrobielle DNA konnten bereits aus Halit-Kristallen gewonnen werden (Mormile et al. 2003; Schubert et al. 2010; Fish et al. 2002; Sankaranarayanan et al. 2011). Es ist daher möglich, dass die mikrobielle Gemeinschaft in der Kavernensole zum Teil während des Solungsprozesses aus dem Salzgestein gelöst wurde. Eine weitere Ursache für den Eintrag der Mikroorganismen ist das Einleiten von Wasser während der Solung. Dieses Wasser wird nach der Solung recycelt. Eine Möglichkeit für die Wiederverwertung ist der Einsatz für die Chlor-Alkali-Elektrolyse. Die Sole hat dadurch eine

stark verringerte Salzkonzentration (Dünnsale) und einen erhöhten pH-Wert und wird erneut für die Solung anderer Kavernen eingesetzt, was das Vorhandensein von Alkali-Halophilen, wie die gefundenen *Natronomonas*, erklären kann. Von der Bohrung bis zur Fertigstellung einer Kaverne können bis zu 10 Jahre vergehen. Man kann sich vorstellen, dass es währenddessen zu Konzentrationsunterschieden in der Sole kommt. Der osmotische Druck der durch die gelösten Na^+ , Mg^+ und Cl^- Ionen entsteht, selektiert nach halophilen Mikroorganismen der mikrobiellen Gemeinschaft. Eine Möglichkeit weniger Energie zu verbrauchen, ist die *salt-in* Osmoadaption, wobei vermehrt Ionen aus dem umgebenden Medium im Cytoplasma akkumuliert werden (Gunde-Cimerman et al. 2018). Diese Form der Anpassung wurde für halophile Archaeen (*Halobacteria*) und *Firmicutes* beschrieben, die einen großen Teil der Kavernengemeinschaft ausmachten. Für sulfatreduzierende *Proteobacteria* liegen wenige Informationen vor, aber eine Osmoadaption über die *salt-out* Strategie wird angenommen (Oren 1999; Belyakova et al. 2006). Die Kavernengemeinschaft einer Lagerstätte für kontaminierten Sand war von vergleichbarer Zusammensetzung (Bordenave et al. 2013). Bordenave und Kollegen beschrieben, dass die Salzgehalte bei 16 % NaCl lagen und sich die mikrobielle Gemeinschaft aus methanogenen Archaeen, *Firmicutes* und *Proteobacteria* zusammensetzt. Die untersuchte Salzformation in Kanada entstammte dem Devon (Weides et al. 2013) und hatte einen deutlich verringerten Salzgehalt im Vergleich zu den, in dieser Arbeit untersuchten, Salzkavernen. Dies kann das Vorhandensein von Methanogenen erklären. Genutzt wurden die von Bordenave et al. untersuchten Kavernen als Speichermedium für Öl-kontaminierten Sand, was das Vorhandensein von Kohlenwasserstoffabbauern erwarten lässt (Bordenave et al. 2013). Neben dem Solungsprozess können Mikroorganismen über das Einspeisen von Gasen oder Ölen als Speicher- und Abdeckmedien in die Kavernen eingetragen werden. Was zusätzlich das Vorhandensein von Kohlenwasserstoffabbauern erklärt. In verschiedenen Studien wurden *Moraxella* spp., *Acinetobacter* sp. und *Balneolaceae* spp. mit dem Kohlenwasserstoffabbau in (salinen) Ökosystemen in Verbindung gebracht (Al-Sharidah et al. 2000; Chikere et al. 2011; Fondi et al. 2013; Zhang et al. 2022).

Halophile Mikroorganismen wurden bereits in anderen hypersalinen Habitaten beschrieben. Auffällig ist dabei, dass die Mikroorganismen oft aus Habitaten mit Salzgehalten nahe der Sättigungsgrenze gesammelt aber bei deutlich geringeren Salzgehalten kultiviert wurden

(Sorokin et al. 2012a; Belyakova et al. 2006; Sorokin et al. 2011b). So wird zwar ermöglicht, in einigermaßen überschaubaren Zeiträumen ausreichend hohe Zellzahlen und Stoffumsätze zu erreichen, aber Aussagen über Stoffwechselprozesse und -raten bei Salzsättigung bzw. Kavernenrelevanten Bedingungen können so nicht getroffen werden.

Fermentierende und acetogene Mikroorganismen

Für einige Isolate der *Halanaerobiales* und *Halobacteriales* wurde Wachstum bei Salzgehalten zwischen 30 und 37 % berichtet (Zeikus et al. 1983; Cayol et al. 1996). Zusätzlich werden viele ihrer Vertreter als moderat halophil beschrieben, da sich ihr Wachstumsverhalten bei Laborversuchen von dem im natürlichen Habitat unterscheidet (Sorokin und Muyzer 2010). *Halanaerobium* spp. wurden in allen Kavernen nachgewiesen. Diese Organismen sind in der Lage Acetat, Formiat und Ethanol über Glukosefermentation zu produzieren (Liang et al. 2016; Abdeljabbar et al. 2013). In Komplexmedium mit Glukose ist *H. praevalens* außerdem in der Lage Laktat, Propionat und Butyrat zu produzieren (Zeikus et al. 1983). Substanzen, die in geringen Mengen in den Kavernen nachgewiesen wurden. *H. hydrogeniformans* wurde ursprünglich aus dem haloalkalinen Soap Lake (Washington, USA) mit hohen Sulfidkonzentrationen isoliert und als außerordentlicher H₂ Produzent identifiziert (Begemann et al. 2012; Brown et al. 2011). Diese Beispiele weisen auf die Möglichkeit hin, dass die gefundenen SCFAs durch mikrobielle Aktivität entstanden sein können. Des Weiteren lassen die geringen Konzentrationen sowohl auf eine anabolische als auch katabolische mikrobielle Aktivität schließen. Zusätzlich dazu ist H₂ Produktion möglich und bestärkt die Annahme von Homoacetogenese im System Salzkaverne. Ein halophiles, homoacetogenes Bakterium, *Acetohalobium arabaticum*, wurde bereits isoliert (Zavarzin et al. 1994; Zhilina und Zavarzin 1990). Dieses wurde ebenfalls in den Proben der Kaverne Cav-B nachgewiesen. Der Referenzstamm wuchs unter lithotrophen Bedingungen und produzierte Acetat bei Salzkonzentrationen bis 25 % NaCl, ein weiterer Vertreter der Halanaerobiales, *Natroniella acitega*, produziert Acetat aus organischen Verbindungen wie Laktat und Ethanol (Zhilina und Zavarzin 1990).

Sulfidogene Mikroorganismen

Acetat und andere kurzkettige Fettsäuren können als Kohlenstoffquellen für lithotroph lebende Prokaryoten oder als Elektronendonoren dienen. In anaeroben Systemen ist Nitrat

ein exzellenter Elektronenakzeptor, gefolgt von Nitrit, Eisen (III), Sulfat und Karbonat (Madigan et al. 2018). Eisen(III)-Reduktion wurde bis zu einer Salinität von 30 % NaCl bestätigt (Emmerich et al., 2012). Sulfat wurde in allen Kavernen in hohen Konzentrationen (40,8 mM, Tabelle 23) nachgewiesen. In Laborversuchen wurde Sulfatreduktion bis 4 M NaCl unter Oxidation von Propionat und Butyrat beschrieben (Sorokin et al. 2008; Sorokin et al. 2010a). *In-situ* Sulfatreduktion bei 5,8 M NaCl wurde entweder nicht oder nur in geringem Ausmaß beobachtet (Kulp et al. 2006; Kulp et al. 2007; Kerkar und Bharathi 2007). Halophile Bakterien, die mit Sulfatreduktion oder Sulfidogenese assoziiert sind, gehören unter anderem der Ordnung *Desulfovibrionales* an (Sorokin und Chernyh 2017; Antunes et al. 2008; Sorokin et al. 2011a; Sorokin et al. 2012c). In allen Kavernen wurden SRBs detektiert, die dieser taxonomischen Gruppe angehören (Abbildung 8). Deren halophile (nicht halonatronophile) Vertreter werden derzeit in einer Familie, *Desulfohalobiaceae*, zusammengefasst und umfassen zwei Spezies, *Desulfohalobium* spp. und *Desulfovermiculus* spp. Eine Spezies, *Desulfovermiculus halophilus*, wurde aus einem Ölfeld isoliert und detailliert untersucht. Sie hob sich durch autotrophes Wachstum unter sulfatreduzierenden Bedingungen bis 3,8 M NaCl von den anderen Mikroorganismen dieser Gruppe ab (Belyakova et al. 2006). Des Weiteren wurde heterotrophe Sulfatreduktion mit Formiat, Butyrat, Laktat und Ethanol nachgewiesen, nicht aber mit Acetat (Belyakova et al. 2006; Kuever 2014). Zusätzlich wurden in drei Kavernen (Cav-C, Cav-D, Cav-E) sulfidogene Archaeen aus dem Phylum *Halobacterota* gefunden. Lithoheterotrophe *Halodesulfurarchaea* spp. wurden aus hypersalinen, anaeroben Sedimenten angereichert (Sorokin et al. 2017b). Sulfidogenese erfolgte mit Formiat-H₂ und Schwefel oder Thiosulfat, nicht aber mit Sulfat. Das Salzoptimum dieser Archaeen ist mit 3,5 bis 4,0 M besonders hoch. Ähnliches gilt für heterotrophe *Halorhabdus* spp., die aus dem Great Salt Lake und Rotem Meer sowie aus Bohrkernen isoliert wurden. Die Salzkonzentrationen dieser Habitats waren vergleichbar mit denen der untersuchten Kavernen, in welchen ebenfalls *Halorhabdus* spp. nachgewiesen wurden. Das Wachstum war fermentativ und ging mit der Bildung von Sulfid einher. Auffällig war das besonders hohe NaCl-Optimum der Zellen, welches bei 4,6 M NaCl lag und der Salinität der Kavernen entsprach (Wainø et al. 2000; Antunes et al. 2008; Albuquerque et al. 2016).

4.2 Einfluss von H₂ auf Sulfidogenese und MIC

Nachdem genug Material für die Analyse der Hydrochemie und mikrobiellen Diversität der Kavernenproben zur Verfügung stand, konnte das Restmaterial für kultivierungsbasierte Versuche genutzt werden. Aufgrund des begrenztes Probenvolumens war jedoch die Anzahl der Testparameter limitiert. Die Kultivierungsversuche zeigten deutlich, dass mikrobielle Proliferation und Stoffwechsel in der Kavernensole mit einem halophilen Inokulum anderer Herkunft möglich sind. Für das Monitoring mikrobieller Aktivität, in Form von H₂ Oxidation wurde der H₂ Verbrauch (3.2.1) sowie die Veränderung in der H₂ Isotopensignatur verwendet (3.2.2). Diese Methoden sind sensitiv und verbrauchen keine Kulturflüssigkeit, jedoch ist die Messung von H₂ Gas über lange Versuchszeiträume oder durch viele Messung fehleranfällig, da H₂ aufgrund der geringen Molekülgröße leicht entweichen kann.

Einfluss auf Proliferation und Metabolismus

In den Ansätzen mit natürlicher Sole (VR 1-5) zeigte sich keine Schwefelwasserstoffbildung, die optisch als schwarze Eisensulfid-Präzipitation leicht sichtbar ist. Bestätigt wurde jedoch, dass die Sole der beprobten Salzkavernen mikrobielle Proliferation und Metabolismus erlaubt (KR 1-5). Die Versuche wurden nur unter Wasserstoffatmosphäre inkubiert, um die künftigen Speicherbedingungen zu simulieren. Durch fehlendes CO₂ im Gasraum und Freisetzung von CO₃²⁻ aus dem Salz änderte sich der pH-Wert von 6,0-6,5 direkt nach der Probenahme auf 7,0 in den Versuchsansätzen. Da Sulfidproduktion und ein Anstieg der Zellzahl in diesen Ansätzen nachweisbar waren, ist eine pH-Abhängigkeit anzunehmen. Für viele halophile SRBs sind pH-Optima zwischen 6,5 und 7,2 angegeben (Belyakova et al. 2006; Ollivier et al. 1991), die sich bis zu pH-Werten von 10 für (halo-)natronophile SRBs erstrecken (Sorokin et al. 2015b; Sorokin et al. 2012b). Für die Sulfidogenese aus 5 mM Sulfat werden 20 mM H₂ benötigt. Der erhöhte H₂ Verbrauch von 32 mM deutet darauf hin, dass neben Sulfatreduktion weitere H₂ konsumierende Prozesse stattgefunden hatten oder dass zusätzliches Sulfat reduziert wurde, welches sich aus dem Salzgestein nachlöste. Dies wurde zum einen in KR 6 beobachtet, in welcher der initiale Sulfatgehalt in den ersten 28 Tagen der Inkubation von 10 mM auf 30 mM stieg, zum anderen wurde in diesem Zeitraum auch eine Erhöhung des Sulfatkonzentration um 1-2 mM in den Proben VR 1-5 festgestellt. Die Sulfatreduktionsrate (SRR) von 27,5 μmol dm⁻³ d⁻¹ liegt im Bereich der Werte, welche in Sodaseen mit hoher Salinität (> 8,7 M Na⁺)

gemessen wurden und zwischen 12 und $400 \mu\text{mol dm}^{-3} \text{d}^{-1}$ lagen (Foti et al. 2007; Foti et al. 2008). Studien am Great Salt Lake zeigten außerdem, dass ein Zusammenhang zwischen der Salzkonzentration und der Sulfatreduktionsrate bestand. In Bereichen mit geringer NaCl-Konzentration (2 M) wurde eine SRR von $6,1 \pm 0,8 \text{ mmol dm}^{-3} \text{d}^{-1}$ gemessen, wohingegen in Bereichen mit hoher NaCl-Konzentration ($4,6 \text{ M}$, vergleichbar mit den Soleproben der Kavernen) eine SRR von $32 \mu\text{mol dm}^{-3} \text{d}^{-1}$ bestimmt wurde (Brandt et al. 2001). Aus den anoxischen, hypersalinen Sedimenten des Great Salt Lake wurde ein SRB isoliert, *Desulfohalobium utahense* (Jakobsen et al. 2006). Zu dieser Familie gehören ebenfalls die in der Anreicherungskultur MP-32 dominierenden *Desulfohalobiaceae* spp., sowie *Desulfohalobium retbaense* und *Desulfovermiculus halophilus* (Ollivier et al. 1991; Belyakova et al. 2006). Um den osmotischen Druck des Mediums zu kompensieren, nehmen SRBs über die *salt-out* Strategie organische Moleküle aus dem Medium auf oder synthetisieren diese selbst (Oren 2011). Für *D. utahense* wurde bestätigt, dass eine Mischung aus Glycinbetain, Trehalose, Saccharose und Cholin oder Hefeextrakt als Osmolyte dienen und einen vergleichbaren positiven Effekt auf das Wachstum der Zellen bei einer Salzkonzentration von $1,7 \text{ M}$ hatten (Jakobsen et al. 2006). Die Synthese der organischen Moleküle erfordert keine Anpassung des Proteoms an erhöhte intrazelluläre Salzkonzentrationen, was den breiten NaCl-Tolerationsbereich der oben genannten Isolate von $0,3$ bis $4,1 \text{ M NaCl}$ erklärt (Jakobsen et al. 2006). Das Wachstum der Anreicherungskultur MP-32 bei $4,7 \text{ M NaCl}$ mit zusätzlich Steinsalz erweitert den bekannten NaCl-Bereich für *Desulfohalobiaceae* spp. und deutet zeigt, dass SRB in der Kavernensole proliferieren können, auch wenn keine organischen Moleküle künstlich zugegeben werden. Wird H_2 in UGS gelagert sind die Bedingungen für hydrogenotrophe Sulfatreduktion nicht limitierend und HS^- wird im Überschuss gebildet. Eine Reoxidation des gebildeten HS^- durch schwefeloxidierende Bakterien (SOB) ist in anaeroben Systemen an die Reduktion von Nitrat durch *Thioalkalivibrio* spp. und weitere Gammaproteobakterien gekoppelt (Sorokin et al. 2003; Sorokin et al. 2006; Sorokin et al. 2011a). Entsprechende Vertreter wurden in den Soleproben und der Anreicherungskultur MP-32 nicht nachgewiesen und es ist von einer Sulfid-Akkumulation auszugehen (Abbildung 10 B).

Einfluss von H₂ auf mikrobiell induzierte Korrosion an Eisenprüfkörpern (EPK)

Um die Auswirkungen einer möglichen Sulfidbildung auf die MIC an EPK zu untersuchen, wurden EPK in Soleproben in einer H₂ Atmosphäre inkubiert. Wie in den Ansätzen ohne EPK (Abschnitt 3.2.1), wurde auch in den Ansätzen mit EPK und nativer Soleprobe kein Sulfid produziert (Abschnitt 3.2.2). In den Kontrollen mit *D. halophilus* bzw. künstlich zugegebenem Sulfid war aber die Bildung eines Niederschlages bzw. einer Kruste auf den EPKs zu sehen (Abbildung 11 AF). Die mikroskopischen Aufnahmen zeigen, dass mit *D. halophilus* unterschiedlich hohe Plaques gebildet wurden, was für einen mikrobiellen Aufwuchs auf den EPK spricht, von dem aus dann die Bildung von Sulfid und Kruste ausgeht. Die Zugabe von H₂ im Überschuss verstärkte die Bildung der Kruste in VR 4, aber auch ohne H₂ war die Bildung einer schwarzen Kruste auf den EPK in VR 4 sichtbar, so dass entweder H₂ abiotisch durch die Reaktion des EPK mit Wasser gebildet wurde oder dass die Elektronen für die Sulfatreduktion über direkten extrazellulären Elektronentransfer aus dem EPK aufgenommen wurden. Die abiotische Bildung von H₂ an dem EPK ist thermodynamisch ungünstig und macht einen direkten Elektronentransfer zwischen dem Mikroorganismus, *D. halophilus*, und dem EPK wahrscheinlicher (Venzlaff et al. 2013). Der Modellorganismus wurde wegen der phylogenetischen Nähe zu den in den Soleproben gefundenen SRBs ausgewählt und weil die MIC anderer, phylogenetisch naher SRBs bereits charakterisiert wurde (Enning und Garrelfs 2014). Direkter extrazellulärer Elektronentransfer kann bisher nicht auf einen genetischen Marker zurückgeführt werden (Koch und Harnisch 2016), wird jedoch mit der Expression von verschiedenen Cytochromen in Verbindung gebracht (Lovley 2012; Zhou et al. 2022). Um die möglichen elektroaktiven Eigenschaften von *D. halophilus* genauer zu untersuchen, eignen sich elektrochemische Versuche in denen eine polarisierte Elektrode als extrazellulärer Elektronendonator dient (Logan et al. 2019; de Campos Rodrigues und Rosenbaum 2014). Dieses Vorgehen diente bereits zur Charakterisierung der Fe⁰-oxidierenden Eigenschaften von genetisch modifizierten *Geobacter sulfurreducens* (Tang et al. 2019).

Die Kruste kann in beiden Ansätzen auch durch den Niederschlag von FeS mit im Medium oder in der Kavernenprobe befindlichem Eisen gekommen sein. Dies zu kontrollieren ist schwer, da auf gelöstes Eisen als Spurenelement bei der Kultivierung nicht verzichtet werden kann. Außerdem können die verwendeten Methoden keine Information, inwiefern die Funktionalität des Materials durch die Bildung der Kruste eingeschränkt ist bzw. bei noch

längerer Inkubation eingeschränkt wird. Hier müssen materialspezifische Tests zur Zugfestigkeit und Dichtheit nachgeschaltet werden.

4.3 Mikrobielle Aktivität in der Kavernensole

Mikroorganismen wurden in den untersuchten Salzkavernen nachgewiesen und angereichert (Abschnitt 3.1 und 3.2.1). Des Weiteren ist bekannt, dass Mikroorganismen aus diesen Habitaten in Medien mit verringerter Salzkonzentration kultiviert wurden (Bordenave et al. 2013). Es besteht jedoch eine Diskrepanz, wenn mikrobiologische Stoffwechselprozesse bei verringerten Salzgehalten untersucht - und Rückschlüsse auf diese Prozesse im natürlichen Habitat gezogen werden. In den Inkubationsversuchen der gewonnenen Sole mit Wasserstoff wurden weder Wasserstoffverbrauch noch Sulfidproduktion beobachtet (vgl. Abbildung 9). In den Kontrollansätzen mit der extrem halophilen Anreicherungskultur MP-32 war ein Wasserstoffverbrauch messbar. Sulfid wurde ebenfalls produziert, was indirekt durch die Bildung von FeS erkennbar war. Auch diese Prozesse waren langsam und erstreckten sich über den Versuchszeitraum von 180 Tagen. Das liegt zum einen daran, dass Osmoadaptionsstrategien energieintensiv sind und zum anderen, dass Primärproduktion, Zellerhalt und Wachstum mit der limitierten Energie erfolgen müssen, die in chemolithotrophen Prozessen gewonnen wird. Kultivierungsbasierte Ansätze zur Einordnung mikrobieller Aktivität in Sole sind nicht nur durch die „Nicht-Kultivierbarkeit“ des Großteils der Mikroorganismen verfälscht (Staley und Konopka 1985), sondern auch durch die begrenzte Aussage, ob ein Prozess nicht oder sehr langsam abläuft. Auf Einzelzellebene kann die mikrobielle Aktivität sensitiv über die Inkorporation von markiertem Kohlenstoff und Wasserstoff mit einem nanoSIMS gemessen werden (Kopf et al. 2015; Musat et al. 2016). Die Anreicherung in den Zellen erlaubt dann Vergleiche mit der natürlichen Abundanz dieser Atome in der Umwelt und somit eine Einordnung über die Aktivität der Zellen. Wasser und Bikarbonat wurden als Marker ausgewählt, weil sie in jedem Fall Teil des natürlichen Habitats „Salzkaverne“ sind. Eine Markierung mit Acetat oder anderen Kohlenstoffquellen wäre denkbar, jedoch würden diese Substanzen das zu erwartende Kohlenstoffangebot verändern, insbesondere wenn sie in den für den Isotopennachweis notwendig hohen Konzentrationen eingesetzt werden. Um die Inkorporation von ^2H und ^{13}C in mikrobiellen Zellen gleichzeitig zu messen, war die Etablierung einer Methode nötig. Um Deuterium an einem nanoSIMS zu messen, können theoretisch verschiedene Ionen verwendet werden. Diese sind $^1\text{H}^-/^2\text{H}^-$, C^1H^-

$/C^2H^-$, $C_2^1H^-/C_2^2H^-$ und O^1H^-/O^2H^- . Da die Methodik jedoch destruktiv ist und ein Sichtfeld nicht mehrmals gemessen werden kann, muss sichergestellt werden, dass in einer Messung genügend Informationen generiert werden. Das heißt, neben den verschiedenen D-Ionen sollten auch andere Ionen differenziert detektiert werden können. Für mikrobiologische Ansätze sind C-, N-, P- und S-Ionen von besonderem Interesse, da sie die Hauptbestandteile der Membran-, Protein- und DNA-Bausteine sind. Eine gleichzeitige Messung dieser Ionen ist jedoch nur möglich, wenn das Magnetfeld des nanoSIMS eine ausreichend sensitive Massentrennung der verschiedenen Ionen zulässt. Bei einer gleichzeitigen Messung von H^- bzw. D^- mit den Massen 1 und 2 und der Messung von $^{12}C^{14}N^-$ mit einer Masse von 26 muss also ein Unterschied von 25 Masseinheiten überwunden werden. Dafür wurde der letzte, eigentlich immobile achte Detektor mechanisch versetzt. Zwar konnten H^-/D^- Ionen gemessen werden, jedoch war die MRP nicht so hoch wie für die anderen Ionen, wo sie bei > 16.000 lag. Ähnlich hohe Werte wurden für das C_2H^-/C_2D^- Ion aus abiotischen Proben beschrieben (Slodzian et al. 2014).

Einfluss von Wasserstoff auf Einzelzellebene

Die Messung von $^1H/^2H$ wird in den Materialwissenschaften erfolgreich eingesetzt (Li et al. 2020). In der Mikrobiologie sind Erfahrungen mit der Messung von Wasserstoff-Isotopen auf organischen Proben rar und die für das handelsübliche Cameca nanoSIMS 50L vorhandenen Referenzen enden meistens mit Vorschlägen möglicher rechnerischer $^1H/^2H$ -Korrektur der unaufgelösten Isobareninterferenz (Berry et al. 2015), enthalten Kommentare zu einer notwendigen Anpassung der Detektorenposition (Kopf et al. 2015) oder sehen eine technische Veränderung (Slodzian et al. 2014) des nanoSIMS Gerätes vor.

Zur Bestimmung der mikrobiellen Aktivität wurde die intrazelluläre Akkumulation von 2H und ^{13}C in Abhängigkeit von H_2 als Elektronendonator gemessen. Zum einen wurde die Aktivität einer halophilen Anreicherungskultur MP-32 in Medium (1,7 M NaCl) und Kavernensole (4,7 M NaCl) bestimmt (Abbildung 15 A) und zum anderen wurde die Aktivität der natürlichen mikrobiellen Gemeinschaft in Soleproben von zwei unterschiedlichen Kavernen evaluiert (Cav-B und Cav-C, Abbildung 15 BC). Ansätze ohne isotopisch markierte Substanzen dienen als Negativkontrolle um die natürliche Häufigkeit von 2H und ^{13}C zu bestimmen.

Die Versuche mit der Anreicherungskultur MP-32 (1,7 M NaCl im Medium) zeigen eine Deuterium-Anreicherung von bis zu 2 At. % bei einem Tracer-Einsatz von 15 % nach einer Inkubationszeit von 7 Tagen. Diese Werte waren geringer als die Deuterium Werte, die von Berry und Kollegen in Reinkulturen in komplexen Medium nach bereits nach 30 Minuten gemessen wurden (9 At. % ^2H für *N. gargensis*) (Berry et al. 2015). Jedoch wurden die gesetzten Schwellenwerte für ^2H überschritten und es kann von mikrobieller Aktivität ausgegangen werden. Aktivität und Proliferation waren jedoch durch die erhöhten Salzgehalte und autotrophen Bedingungen limitiert. Dies wurde durch die Inkubation von MP-32 in Kavernensole bestätigt. Der erhöhte NaCl-Gehalt resultierte in einer noch geringeren Anreicherung in ^2H bis 0,4 At. %. Protonen für die Lipidbiosynthese werden in großen Mengen aus Wasser verwendet, unter Bedingungen mit natürlicher Häufigkeit ergeben sich dabei Spezies-spezifische Anreicherungsmuster (Sessions et al. 1999). Weil Lipide aber nur einen geringeren Anteil an der Biomasse ausmachen, als Proteine oder DNA und weil die Proliferation unter hypersalinen und autotrophen Bedingungen verlangsamt ist, sind die gemessenen Werte geringer als die von Berry. Eine weitere Auftrennung der Zellen in Gruppen mit mehr oder weniger ^2H Anreicherung war nicht festzustellen, was die Annahme erlaubt, dass es Zellen einer Spezies sind (Calabrese et al. 2021). Bei Versuchen mit $^2\text{H}_2\text{O}$ konnte beobachtet werden, dass bei Vorhandensein von Mikroorganismen ^2H aus $^2\text{H}_2\text{O}$ in $^2\text{H}^1\text{H}$ umgewandelt wird (Löffler et al. 2019). Für die Versuchsansätze mit $^2\text{H}_2\text{O}$ gilt also, dass das Deuterium sowohl in Form von $^2\text{H}_2\text{O}$ als auch $^2\text{H}^1\text{H}$ zur mikrobiellen Verfügung steht. Molekularer Wasserstoff wird von Hydrogenasen oxidiert und die entstehenden Protonen werden durch die ATP-Synthase in die Zellen aufgenommen, wo sie auf Reduktionsäquivalente übertragen werden. Denkbar ist also der Einbau von Deuterium bei Reaktionen die Protonentransporter wie NAD^+ und NADP^+ involvieren (Taubert et al. 2018). Diese Reaktionen sind Fettsäuresynthese und Redoxreaktionen zur Energiegewinnung. Deuterium kann also sowohl direkt in die Lipide eingebaut werden als auch, ausgehend von Acetyl-CoA, in die Monomere für Polypeptide und Nukleinsäuren.

Im Gegensatz zu der Inkorporation von ^2H war die Inkorporation von ^{13}C abhängig von H_2 und insgesamt 12,92 % Zellen von MP-32 nahmen bei Vorhandensein von H_2 ^{13}C aus dem Medium auf (Abbildung 15 A, schwarz). Ohne H_2 waren nur 1,91 % der Zellen angereichert und es war eine Aufteilung der nicht angereicherten Zellen zu beobachten (1,00 At. % ^{13}C und 1,05 At. %,

Abbildung 15 A, grau). Bei Inkubation von MP-32 in Kavernensole waren es 6,17 %. Gründe für den unterschiedlichen Anteil in ^{13}C angereicherter Zellen können der veränderte NaCl Gehalt, die zusätzlichen C Quellen der Soleprobe (Konzentrationen siehe Tabelle 24) und die mikrobielle Gemeinschaft von MP-32 gewesen sein. Das Inokulum setzte sich vorwiegend aus *Halanaerobiaceae* spp. und *Desulfohalobiaceae* spp. zusammen (Abbildung 10 A, KR 6), nach der Inkubation Medium waren beide Taxa abundant, während nach der Inkubation in Soleproben *Desulfohalobiaceae* spp. dominierten (Abbildung 10 A, KR 2). Die in der Soleprobe nachgewiesenen SCFAs Acetat, Formiat und Butyrat können als C Quellen für SRBs dienen (Rabus et al. 2015; Sorokin et al. 2010b) und so den Anteil ^{13}C aufnehmender Organismen verringern.

Charakterisierung der Anreicherungskultur MP32

Um genauere Informationen zu der Anreicherungskultur MP32 zu erhalten, wurde deren Metagenom bestimmt. Auffällig sind zwei SRBs, die durch das Vorhandensein der Gene für die Schlüsselenzyme der dissimilatorische Sulfatreduktion identifiziert wurden, und gleichzeitig über Gene für die Schlüsselenzyme des WLP verfügen. Die taxonomische Zuordnung dieser MAGs erfolgte zu *D. halophilus* und der Familie *Desulfohalobiaceae*. Diese Familie umfasst derzeit zwei Genera, *Desulfohalobium* spp. und *Desulfovermiculus* spp. *Desulfovermiculus halophilus* wächst bei NaCl Konzentrationen von 0,5 – 3,9 M sowohl heterotroph, als auch autotroph (Belyakova et al. 2006). Was Vertreter dieser Taxa als potenzielle Risikokandidaten für H_2 UGS und die damit einhergehende Sulfidproduktion identifiziert. Der Proteom pl dieser Taxa war 6,7 bzw. 6,4 (Abbildung 22) und damit ähnlich dem Proteom pl nicht halophiler Vertreter wie *Desulfovibrio vulgaris* (pl = 6,8). Dies bestätigt eine Adaption an variable Salzgehalte durch die *salt-out* Strategie ohne Proteommodifikation (Gunde-Cimerman et al. 2018; Belyakova et al. 2006). Die verwendeten organischen Moleküle zur Kompensation des osmotischen Drucks sind jedoch unbekannt.

4.4 Auswirkungen von Salzgehalt und Kohlenstoffquellen auf Wachstum und Stoffwechsel unter sulfatreduzierenden Bedingungen

Die Grundlage von verfügbaren Kohlenstoffquellen ist Primärproduktion durch CO_2 -Fixierung. Darauf können andere Stoffwechselprozesse aufbauen und in der Produktion von SCFAs resultieren. Diese sind wiederum potenzielle C Quellen für acetogene und SRBs. In einem

Mikrokosmenexperiment wurde die Effekte verschiedener C Quellen bei variierenden Salzkonzentrationen (2,5 M, 3,4 M und 4,4 M) unter H₂-Gasatmosphäre getestet. Die Versuche wurden in Minimalmedium mit Bicarbonat-Carbonat-Puffersystem und H₂/CO₂ durchgeführt und über einen Zeitraum von 125 Tagen beprobt. Hydrogenophile Acetogenese über den WLP war ein zentraler Stoffwechselweg in allen Mikrokosmen. Bei allen niedrigen und mittleren Salzkonzentrationen und allen C Quellen wurde zudem innerhalb von 125 Versuchstagen eine Sulfatreduktion verzeichnet. Nach Auswertung der Metagenomdaten konnte die Acetogenese dem Genus *Acetohalobium* und möglicherweise einer anderen Familie der *Halanaerobiales* zugeordnet werden, die sich phylogenetisch zwischen *Halanaerobiaceae* und *Halobacteroidaceae* befindet. Ein einzelner SRB wurde durch die Identifizierung des vollständigen dissimilatorischen Sulfatreduktionsweges nachgewiesen und dem Genus *Desulfonatronovibrio* zugeordnet. Zusätzlich wurden in den Mikrokosmen mit niedrigen und mittleren Salzgehalten *Methanohalophilus euholabius* mit relativ hoher Abundanz nachgewiesen, Methanbildung aber nur in jenen Mikrokosmen mit Methanol als C Quelle.

Acetogenese

Acetohalobium sp. und möglicherweise auch ein anderes Mitglied der Ordnung *Halanaerobiales* waren in der Lage, über den WLP (Ljungdahl 1969; Sikorski et al. 2010; Zhilina und Zavarzin 1990) Acetat aus CO₂ für das mikrobielle Konsortium zu produzieren. Die hydrochemischen Daten zeigen, dass Acetat bei allen Salzgehalten kontinuierlich produziert wurde, was darauf hindeutet, dass (i) die Acetogenese unabhängig vom Salzgehalt war, (ii) Acetat akkumuliert wurde, (iii) und es weniger effektiv von anderen Mitgliedern des mikrobiellen Konsortiums verbraucht wurde. Die Gründe für die Acetatakkumulation könnten darin liegen, dass die Homoacetogene mehr ATP produzierten oder weniger Energie für die Osmoregulation benötigten. Offenbar ist nach den thermodynamischen Berechnungen bei der Reduktion von CO₂ zu Acetat weniger Energie zu erwarten als bei der Sulfatreduktion (Thauer et al. 1977). In autotrophen Homoacetogenen ist die Nettoproduktion von ATP aus der Phosphorylierung auf Substratebene gleich Null und muss daher durch die Aktivität der ATP-Synthase erreicht werden, die entweder durch einen H⁺- oder Na⁺-Gradienten angetrieben wird (Müller 2003). Bisher sind drei Arten von energieerhaltenden Komplexen in Acetogenen bekannt, die durch Ionenpumpen gekoppelt sind: eine Ferredoxin:NAD⁺-

Oxidoreduktase (RNF), eine energieumwandelnde Hydrogenase (ECH) und der Methylviologen (MV)-reduzierende Hydrogenase (MvhD) Komplex (Biegel und Müller 2010; Kremp et al. 2022; Schoelmerich und Müller 2019). Die Nutzung eines energiesparenden Komplexes, der gleichzeitig die Na⁺-Translokation reguliert, könnte ein Grund für das effiziente Wachstum von *Acetohalobium* sp. sein. Der Typ-Stamm *Acetohalobium arabaticum* konnte 25 mM Acetat produzieren, wenn er in Reinkultur bei niedrigem Salzgehalt kultiviert wurde, und der Salzgehaltbereich für das Wachstum lag zwischen 1,7 und 4,3 M NaCl (Zhilina und Zavarzin 1990). Die Erzeugung einer Protonenmotivationskraft ist auch für die Art der Osmoanpassung erforderlich. Es ist bekannt, dass einige Halanaerobiales zu den *salt-in*-Strategen gehören, die den osmotischen Druck mit hohen intrazellulären Konzentrationen von Na⁺, K⁺, Cl⁻ Ionen ausgleichen, aber keinen sauren Proteom-pI aufweisen (Bardavid und Oren 2012; Oren 2013). Die vorliegenden Daten bestätigen einen ähnlichen Proteom-pI und implizieren diesen Modus der Osmoadaption für die gefundenen *Halanaerobiiia*. Dies ermöglicht es diesen Mikroorganismen, auch bei hohem Salzgehalt aktiv zu sein. Allerdings war die Zellzahl bei hohem Salzgehalt viermal niedriger als bei mittlerem Salzgehalt.

Sulfatreduktion

Alle SRBs wurden der Ordnung *Desulfovibrionales* zugeordnet (Abbildung 18, 21), deren genetische Information nicht für einen vollständigen CO₂-Fixierungsweg kodiert und die wahrscheinlich auf externe C-Quellen angewiesen sind. Sowohl Acetat als auch Methanol wirkten sich positiv auf die Sulfatreduktion aus, was durch die Tatsache bestätigt wird, dass Sulfat nach 1445 Tagen im hohen Salzgehalt mit diesen zusätzlichen C-Quellen vollständig verbraucht war. Obwohl Laktat im Allgemeinen ein günstiges C-Substrat für SRB ist (Santos et al. 2022), hatte es keine positive Wirkung auf die Sulfatreduktionsrate. Außerdem wurden im MAG dieser SRB keine DL-Laktat-Dehydrogenasen kodiert. Hohe Konzentrationen von Acetat in den Mikrokosmen mit Laktat als C-Quelle deuten eher auf eine Umwandlung von Laktat in Acetat hin, was es als Substrat für SRB ausschließt. Andererseits wurde Acetat auch bei hohem Salzgehalt aus CO₂ als C-Substrat hergestellt, so dass Acetat kein limitierender Parameter gewesen sein dürfte. Die Acetatkonzentration lag nach 125 Tagen bei 10 mM und es kann nur spekuliert werden, dass die Sulfatreduktion aktiviert wurde, sobald die Acetatkonzentration >20 mM war. Eine reduzierte Sulfatreduktionsrate bei hohen Salzkonzentrationen wurde für SRBs in einer anaeroben mikrobiellen Co-Kultur mit *Desulfonatronospira* gezeigt, welche eine

Sulfatreduktion bei einer Na⁺-Konzentration von bis zu 3,5 M und eine vollständige Oxidation von 18 mM Acetat während 300 Tagen Inkubation durchliefen (Sorokin et al. 2014a). Andere *Desulfonatronovibrio* spp. (*D. thiodismutans*, *D. magnus* und *D. hydrogenovorans*) wuchsen bei Na⁺-Konzentrationen bis zu 3,0 M und mit H₂ als Elektronendonator für die Sulfatreduktion (Sorokin et al. 2011b). Das Wachstum bei moderaten Salzkonzentrationen wurde mit H₂ und Formiat oder Acetat, nicht aber mit CO₂ beschrieben (Sorokin et al. 2011b; Sorokin et al. 2011a; Zhilina 1997). Der Proteom-pI-Wert der SRB war der höchste von allen in den Mikrokosmen gefundenen MAGs. Für halophile SRB werden beide Osmoadaptionsstrategien berichtet und eine Differenzierung war hier nicht möglich. Allerdings ist die Sulfidogenese aus anderen S-Spezies als Sulfat, wie Thiosulfat und elementarem Schwefel, bei Salzkonzentrationen nahe der Sättigung üblich (Sorokin et al. 2010b). Es besteht die Möglichkeit, dass die SRB als Autotrophe wachsen können, da der Calvin- (Ca) und der umgekehrte Zitronensäurezyklus (rTCA) teilweise in MAG 7 gefunden wurden und der rTCA-Zyklus ein bestätigter C-Fixierungsweg in SRBs ist (Schauder et al. 1987).

Methanogenese

Die Methanogenese wurde nur beobachtet, wenn Methanol als C-Quelle bei niedrigem und mittlerem Salzgehalt angeboten wurde, eine Tatsache, die aus anderen salzhaltigen Systemen bekannt ist (L'Haridon et al. 2020). Das methanogene Archaeum, *Methanohalophilus euhalobius*, war jedoch bei niedrigem und mittlerem Salzgehalt in großer relativer Abundanz vorhanden und bei hohem Salzgehalt in weniger als 3 % des relativen Anteils. Dies deutet auf eine mögliche Beziehung zwischen dem gemeinsamen Auftreten von Methanogenen und SRBs hin, da die Sulfatreduktion beschleunigt wurde, wenn Methanol als C-Substrat vorhanden war. Eine Möglichkeit ist eine Syntrophie zwischen SRB und Methanogenen oder ein unbekannter Sulfatreduktionsweg in den Methanogenen selbst, wie bereits für andere Archaeen vorgeschlagen wurde (Milucka et al. 2012).

4.5 Fazit

Aus den Ergebnissen lassen sich drei zentrale Schlüsse ableiten. Sowohl in den beproben Salzkavernen mit einer NaCl Konzentration von 4,7 M, als auch in der Anreicherungskultur MP-32 (5,6 M NaCl) aus anderen UGS dominieren Mikroorganismen derselben phylogenetischen Gruppen (i). Diese sind *Halanaerobiaeota* spp. und *Desulfalobiaceae* spp. Vertreter dieser Familie können chemolithoautotroph Sulfat reduzieren und Kohlenstoff über den WLP assimilieren. Dies macht sie zu Risikoorganismen für die zukünftige H₂ UGS und erfordert Maßnahmen, die die mikrobielle Proliferation überwachen und begrenzen. Trotz der deutlich höheren Wachstumsrate der extrem halophilen Anreicherungskultur MP-32 beanspruchten die kultivierungsbasierten Versuche einen langen Zeitraum von bis zu 182 Tagen (ii). In Versuchen mit einer moderat halophilen Anreicherungskultur (SF-X) war eine deutliche Abhängigkeit der SRR von dem Salzgehalt festzustellen. Nach 125 Tagen Inkubation war die Sulfatkonzentration bei hoher Salzkonzentration unverändert, aber nach mehr als 1000 Tagen vollständig verbraucht. Dies unterstreicht die Notwendigkeit, Laborversuche zur Abschätzung des mikrobiellen Risikopotentials auf Zeiträume von bis zu 3 Jahren anzulegen und kultivierungsunabhängige Methoden in Betracht zu ziehen. Eine Methode wurde im Rahmen dieser Arbeit etabliert und erlaubt die Detektion von aktiven Mikroorganismen auf Einzelzellebene (iii). Die Aktivität zeigte sich durch die mikrobielle Inkorporation von ²H aus ²H₂O und ¹³C aus H¹³CO₃⁻, welche mittels nanoSIMS nachgewiesen wurden. Diese Methode wurde mit der Anreicherungskultur MP-32 geprüft und an Soleproben von zwei Kavernen getestet. In beiden Fällen erwies sich H₂ als zusätzlicher Elektronendonator begünstigend auf die Inkorporation der Substrate. So konnten aktive Zellen in den Soleproben nachgewiesen werden, bevor Stoffumsätze wie Sulfat- oder Wasserstoffverbrauch messbar waren. Aus den Ergebnissen lässt sich die grundlegende Funktion der entwickelten Methode feststellen. Aufgrund der geringen Anzahl an Versuchen lassen sich aber noch keine Aussagen über deren Robustheit treffen. Diesen Nachweis können Folgeexperimente liefern, deren Form und Umfang unter anderem Teil des Ausblicks sind.

5 Ausblick

Die entwickelte nanoSIMS-Methode zum Nachweis mikrobieller Aktivität wurde auf zwei Soleproben angewandt. In einer der Soleproben waren die mikrobiellen Zellen in ^{13}C und ^2H angereichert, wohingegen die Zellen in der anderen Soleprobe nur in ^2H angereichert waren. Tests mit MP-32 zeigen weiterhin, dass die ^{13}C Inkorporation abhängig von externen Elektronendonoren (H_2) war, während es die Inkorporation von ^2H Inkorporation nicht war. Ein Grund hierfür kann die unterschiedliche Zusammensetzung und funktionelle Diversität der mikrobiellen Gemeinschaft in den Soleproben gewesen sein. Um diese Hypothese zu testen, müssen die Zellen in der Probe über den Versuchszeitraum quantifiziert und mit dem Anteil in ^{13}C und ^2H angereicherter Zellen verglichen werden. Für einen besseren Vergleich sollten die Anreicherungsmuster von relevanten Mikroorganismen, i.e. dem zentralen Solemikrobiom, in Reinkultur bestimmt werden. Die Metagenome, welche von der Anreicherungskultur MP-32 erhalten wurden, waren von sehr hoher Qualität. Anhand der Sequenzinformation können Sonden entwickelt werden, welche mittels Fluoreszenz bzw. Halogen-*in-situ* Hybridisierung Informationen zu mikrobieller Aktivität und Identität vereinen. Des Weiteren bedarf es einer genaueren zeitlichen Auflösung der Inkorporation von ^{13}C und ^2H , um eine Verbindung zwischen den nanoSIMS Daten mit exakten Messwerten für Sulfat, Sulfid, Zellzahl und Wasserstoffverbrauch herzustellen. Wenn mit den nanoSIMS Messungen reproduzierbar aktive SRBs nachgewiesen werden können, bevor Stoffumsätze und Zellproliferation gemessen werden, könnte man diese Methode als „Frühwarnsystem“ für H_2 -Kavernenbetreiber genutzt werden. Weiterhin müsste geklärt werden, inwiefern die Kavernenwände mikrobiell besiedelt sind. Aufgrund der Kavernengröße nehmen die Wände einen erheblichen Anteil an der für mikrobielle Besiedelung verfügbaren Fläche ein. Weil die Kaverneninfrastruktur und die Sicherheitsregelungen der Betreiber keine direkte Beprobung der Wände zulassen, bieten sich Aufwuchsversuche mit Bohrkernen aus den Salzformationen an.

An der Grenzfläche zwischen unterirdischen Salzformationen und wasserleitenden Gesteinsschichten bildet sich natürliche Sole, welche einen distinkten Lebensraum für halophile Mikroorganismen in der tiefen Biosphäre bildet. Dieses Habitat ist ebenfalls weitestgehend unerforscht und Informationen zu Osmoadaptionsstrategien und mikrobieller Aktivität fehlen. Neben der Salzgesteinsschicht beeinflusst auch das umgebende Gestein die

hydrochemische Zusammensetzung und der Grundwassereintrag die Salinität der Sole. Es ist anzunehmen, dass auch in diesen Habitaten Karbonat und Sulfat als Elektronenakzeptoren zur Verfügung stehen, aber insbesondere Stickstoffquellen limitierend sind. Jedoch ist die Mehrheit der bis dato bekannten mikrobiell synthetisierten, osmoaktiven Substanzen Aminosäurederivate, deren Synthese an die Verfügbarkeit von Ammonium gekoppelt ist. Der Nachweis von schwefelhaltigen osmoaktiven Substanzen in Ozeansedimenten wirft die Frage auf, wie anpassbar mikrobielle Osmoadaptionsstrategien sind. Hat die Zusammensetzung von Gesteinsschichten Auswirkungen auf die Zusammensetzung der intrazellulären osmoaktiven Substanzen und können dadurch neue, noch unbekannte osmoaktive Substanzen erwartet werden? Weitere Metagenom- und Proteomanalysen erlauben außerdem die Detektion von Enzymen, welche an erhöhte Ionenkonzentrationen angepasst sind und für biotechnologische Zwecke genutzt werden können. Natürliche Quelle oder Bohrungen zur Salzgewinnung können Zugang zu diesem Habitat ermöglichen und Untersuchungen der planktonischen mikrobiellen Gemeinschaft erlauben. Die in dieser Arbeit angewandten Methoden, welche auf die veränderten Bedingungen mit hohem Salzgehalt angepasst wurden, können für derartige Standortbeschreibungen genutzt und um Transkriptom-, Proteom- und Metabolomanalysen erweitert werden.

6 Literaturverzeichnis

- Abdeljabbar, H., Cayol, J. L., Ben Hania, W., Boudabous, A., Sadfi, N., Fardeau, M. L. 2013. 'Halanaerobium sehlinense sp nov., an extremely halophilic, fermentative, strictly anaerobic bacterium from sediments of the hypersaline lake Sehline Sebkhah', *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63: 2069-74.
- Acciardo, A., Arnet, M., Brixel, B., Gholizadeh Doonechaly, N., Wenning, Q., Hertrich, M., Magnabosco, C. 2021. Initial Investigations into Microbial Dynamics and Biogeochemical Cycling in the Bedretto Tunnel, *EGU General Assembly 2021*, EGU21-10268.
- Al-Sharidah, A., Richardt, A., Golecki, J. R., Dierstein, R., Tadros, M. H. 2000. 'Isolation and characterization of two hydrocarbon-degrading *Bacillus subtilis* strains from oil contaminated soil of Kuwait', *Microbiological Research*, 155: 157-64.
- Albers, S.-V., Meyer, B. H. 2011. 'The archaeal cell envelope', *Nature Reviews Microbiology*, 9: 414-26.
- Albuquerque, L., Kowalewicz-Kulbat, M., Drzewiecka, D., Stączek, P., d'Auria, G., Rosselló-Móra, R., da Costa, M. S. 2016. 'Halorhabdus rudnickae sp. nov., a halophilic archaeon isolated from a salt mine borehole in Poland', *Syst Appl Microbiol*, 39: 100-5.
- Alexandre, P. 2020. "Isotopes and the natural environment." In. Cham: Springer.
- Alneberg, J., Bjarnason, B. S., de Bruijn, I., Schirmer, M., Quick, J., Ijaz, U. Z., Lahti, L., Loman, N. J., Andersson, A. F., Quince, C. 2014. 'Binning metagenomic contigs by coverage and composition', *Nature Methods*, 11: 1144-46.
- Andrews, S. 2010. 'FastQC: A quality control analysis tool for high throughput sequencing data. Available online at: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>'.
- Antón, J., Oren, A., Benlloch, S., Rodríguez-Valera, F., Amann, R., Rosselló-Mora, R. 2002. 'Salinibacter ruber gen. nov., sp. nov., a novel, extremely halophilic member of the Bacteria from saltern crystallizer ponds', *Int J Syst Evol Microbiol*, 52: 485-91.
- Antón, J., Rosselló-Mora, R., Rodríguez-Valera, F., Amann, R. 2000. 'Extremely halophilic bacteria in crystallizer ponds from solar salterns', *Applied and Environmental Microbiology*, 66: 3052-57.

- Antunes, A., Taborda, M., Huber, R., Moissl, C., Nobre, M. F., da Costa, M. S. 2008. 'Halorhabdus tiamatea sp. nov., a non-pigmented, extremely halophilic archaeon from a deep-sea, hypersaline anoxic basin of the Red Sea, and emended description of the genus Halorhabdus', *Int J Syst Evol Microbiol*, 58: 215-20.
- Bäbel, M., Schreiber, B. C. 2014. '9.17 - Geochemistry of Evaporites and Evolution of Seawater.' in Heinrich D. Holland, Karl K. Turekian (eds.), *Treatise on Geochemistry (Second Edition)* (Elsevier: Oxford).
- Bagnoud, A., Chourey, K., Hettich, R., de Bruijn, I., Andersson, A. F., Leupin, O. X., Schwyn, B., Bernier-Latmani, R. 2016. 'Reconstructing a hydrogen-driven microbial metabolic network in Opalinus Clay rock', *Nature Communications*, 7: 12770.
- Baker, R. O., Yarranton, H. W., Jensen, J. L. 2015. 'Rock and Fluid Properties.' in Richard O. Baker, Harvey W. Yarranton and Jerry L. Jensen (eds.), *Practical Reservoir Engineering and Characterization* (Gulf Professional Publishing: Boston).
- Baliga, N. S., Bonneau, R., Facciotti, M. T., Pan, M., Glusman, G., Deutsch, E. W., Shannon, P., Chiu, Y., Weng, R. S., Gan, R. R., Hung, P., Date, S. V., Marcotte, E., Hood, L., and Ng, W. V. 2004. 'Genome sequence of Haloarcula marismortui: a halophilic archaeon from the Dead Sea', *Genome Res*, 14: 2221-34.
- Bardavid, R. E., Oren, A. 2012. 'The amino acid composition of proteins from anaerobic halophilic bacteria of the order Halanaerobiales', *Extremophiles*, 16: 567-72.
- Begemann, M., Mormile, M., Sitton, O., Wall, J., Elias, D. 2012. 'A Streamlined Strategy for Biohydrogen Production with Halanaerobium hydrogeniformans, an Alkaliphilic Bacterium', *Frontiers in Microbiology*, 3.
- Belyakova, E. V., Rozanova, E. P., Borzenkov, I. A., Tourova, T. P., Pusheva, M. A., Lysenko, A. M., Kolganova, T. V. 2006. 'The new facultatively chemolithoautotrophic, moderately halophilic, sulfate-reducing bacterium Desulfovermiculus halophilus gen. nov., sp. nov., isolated from an oil field', *Microbiology*, 75: 161-71.
- Benlloch, S., López-López, A., Casamayor, E. O., Øvreås, L., Goddard, V., Daae, F. L., Smerdon, G., Massana, R., Joint, I., Thingstad, F., Pedrós-Alió, C., Rodríguez-Valera, F. 2002. 'Prokaryotic genetic diversity throughout the salinity gradient of a coastal solar saltern', *Environmental Microbiology*, 4: 349-60.

Bentley, D.R., Balasubramanian, S., Swerdlow, H.P., Smith, G.P., Milton, J., Brown, C.G., Hall, K.P., Evers, D.J., Barnes, C.L., Bignell, H.R., Boutell, J.M., Bryant, J., Carter, R.J., Keira Cheetham, R., Cox, A.J., Ellis, D.J., Flatbush, M.R., Gormley, N.A., Humphray, S.J., Irving, L.J., Karbelashvili, M.S., Kirk, S.M., Li, H., Liu, X., Maisinger, K.S., Murray, L.J., Obradovic, B., Ost, T., Parkinson, M.L., Pratt, M.R., Rasolonjatovo, I.M.J., Reed, M.T., Rigatti, R., Rodighiero, C., Ross, M.T., Sabot, A., Sankar, S.V., Scally, A., Schroth, G.P., Smith, M.E., Smith, V.P., Spiridou, A., Torrance, P.E., Tzonev, S.S., Vermaas, E.H., Walter, K., Wu, X., Zhang, L., Alam, M.D., Anastasi, C., Aniebo, I.C., Bailey, D.M.D., Bancarz, I.R., Banerjee, S., Barbour, S.G., Baybayan, P.A., Benoit, V.A., Benson, K.F., Bevis, C., Black, P.J., Boodhun, A., Brennan, J.S., Bridgham, J.A., Brown, R.C., Brown, A.A., Buermann, D.H., Bundu, A.A., Burrows, J.C., Carter, N.P., Castillo, N., Catenazzi, M. C. E., Chang, S., Cooley, R. N., Crake, N.R., Dada, O.O., Diakoumakos, K.D., Dominguez-Fernandez, B., Earnshaw, D.J., Egbujor, U.C., Elmore, D.W., Etchin, S.S., Ewan, M.R., Fedurco, M., Fraser, L.J., Fuentes Fajardo, K.V., Furey, W.S., George, D., Gietzen, K.J., Goddard, C.P., Golda, G.S., Granieri, P.A., Green, D.E., Gustafson, D.L., Hansen, N.F., Harnish, K., Haudenschild, C.D., Heyer, N.I., Hims, M.M., Ho, J.T., Horgan, A.M., Hoschler, K., Hurwitz, S., Ivanov, D.V., Johnson, M.Q., James, T., Huw Jones, T.A., Kang, G.-D., Kerelska, T.H., Kersey, A.D., Khrebtukova, I., Kindwall, A.P., Kingsbury, Z., Kokko-Gonzales, P.I., Kumar, A., Laurent, M.A., Lawley, C.T., Lee, S.E., Lee, X., Liao, A.K., Loch, J.A., Lok, M., Luo, S., Mammen, R.M., Martin, J.W., McCauley, P.G., McNitt, P., Mehta, P., Moon, K.W., Mullens, J.W., Newington, T., Ning, Z., Ling Ng, B., Novo, S.M., O'Neill, M.J., Osborne, M.A., Osnowski, A., Ostadan, O., Paraschos, L.L., Pickering, L., Pike, A.C., Pike, A.C., Pinkard, D.C., Pliskin, D.P., Podhasky, J., Quijano, V.J., Raczy, C., Rae, V.H., Rawlings, S.R., Chiva Rodriguez, A., Roe, P.M., Rogers, J., Rogert Bacigalupo, M.C., Romanov, N., Romieu, A., Roth, R.K., Rourke, N.J., Ruediger, S.T., Rusman, E., Sanches-Kuiper, R.M., Schenker, M.R., Seoane, J.M., Shaw, R.J., Shiver, M.K., Short, S.W., Sizto, N.L., Sluis, J.P., Smith, M.A., Sohna Sohna, J.E., Spence, E.J., Stevens, K., Sutton, N., Szajkowski, L., Tregidgo, C.L., Turcatti, G., vandeVondele, S., Verhovskiy, Y., Virk, S.M., Wakelin, S., Walcott, G.C., Wang, J., Worsley, G.J., Yan, J., Yau, L., Zuerlein, M., Rogers, J., Mullikin, J.C., Hurles, M.E., McCooke, N.J., West, J.S., Oaks, F.L., Lundberg, P.L., Klenerman, D., Durbin, R., Smith, A.J. 2008. Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry. *Nature* 456(7218):53-59

Berg, I. A., Kockelkorn, D., Ramos-Vera, W. H., Say, R. F., Zarzycki, J., Hügler, M., Alber, B. E., Fuchs, G. 2010. 'Autotrophic carbon fixation in archaea', *Nature Reviews Microbiology*, 8: 447-60.

Berry, D., Mader, E., Lee, T. K., Woebken, D., Wang, Y., Zhu, D., Palatinszky, M., Schintlmeister, A., Schmid, M. C., Hanson, B. T., Shterzer, N., Mizrahi, I., Rauch, I., Decker, T., Bocklitz, T., Popp, J., Gibson, C. M., Fowler, P. W., Huang, W. E., Wagner, M. 2015. 'Tracking heavy water (D₂O) incorporation for identifying and sorting active microbial cells', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112: E194-E203.

Bianco, P., Haladjian, J., Bruschi, M., Guerlesquin, F. 1992. 'Reactivity of [Fe] and [Ni Fe Se] hydrogenases with their oxido-reduction partner: The tetraheme cytochrome C₃', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 189: 633-39.

Biegel, E., Müller, V. 2010. 'Bacterial Na⁺-translocating ferredoxin:NAD⁺ oxidoreductase', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107: 18138-42.

Bjellqvist, B., Basse, B., Olsen, E., Celis, J. E. 1994. 'Reference points for comparisons of two-dimensional maps of proteins from different human cell types defined in a pH scale where isoelectric points correlate with polypeptide compositions', *Electrophoresis*, 15: 529-39.

Bjellqvist, B., Hughes, G. J., Pasquali, C., Paquet, N., Ravier, F., Sanchez, J. C., Frutiger, S., Hochstrasser, D. 1993. 'The focusing positions of polypeptides in immobilized pH gradients can be predicted from their amino acid sequences', *Electrophoresis*, 14: 1023-31.

BMWi. 2020. 'Die Nationale Wasserstoffstrategie'.

Bokulich, N. A., Kaehler, B. D., Rideout, J. R., Dillon, M., Bolyen, E., Knight, R., Huttley, G. A., Gregory Caporaso, J. 2018. 'Optimizing taxonomic classification of marker-gene amplicon sequences with QIIME 2's q2-feature-classifier plugin', *Microbiome*, 6: 90.

Bolyen, E., Rideout, J. R., Dillon, M. R., Bokulich, N. A., Abnet, C. C., Al-Ghalith, G. A., Alexander, H., Alm, E. J., Arumugam, M., Asnicar, F., Bai, Y., Bisanz, J. E., Bittinger, K., Brejnrod, A., Brislawn, C. J., Brown, C. T., Callahan, B. J., Caraballo-Rodríguez, A. M., Chase, J., Cope, E. K., Da Silva, R., Diener, C., Dorrestein, P. C., Douglas, G. M., Durall, D. M., Duvallet, C., Edwardson, C. F., Ernst, M., Estaki, M., Fouquier, J., Gauglitz, J. M., Gibbons, S. M., Gibson, D. L., Gonzalez, A., Gorlick, K., Guo, J., Hillmann, B., Holmes, S., Holste, H., Huttenhower, C., Huttley, G. A., Janssen, S., Jarmusch, A. K., Jiang, L., Kaehler, B. D., Kang, K. B., Keefe, C. R., Keim, P., Kelley, S. T., Knights, D., Koester, I., Kosciulek, T., Kreps, J., Langille, M. G. I., Lee, J., Ley, R., Liu, Y.-X., Loftfield, E., Lozupone, C., Maher, M., Marotz, C., Martin, B. D., McDonald, D., McIver, L. J., Melnik, A. V., Metcalf, J. L., Morgan, S. C., Morton, J. T.,

Naimey, A. T., Navas-Molina, J. A., Nothias, L. F., Orchanian, S. B., Pearson, T., Peoples, S. L., Petras, D., Preuss, M. L., Pruesse, E., Rasmussen, L. B., Rivers, A., Robeson, M. S., Rosenthal, P., Segata, N., Shaffer, M., Shiffer, A., Sinha, R., Song, S. J., Spear, J. R., Swafford, A. D., Thompson, L. R., Torres, P. J., Trinh, P., Tripathi, A., Turnbaugh, P. J., Ul-Hasan, S., van der Hooft, J. J. J., Vargas, F., Vázquez-Baeza, Y., Vogtmann, E., von Hippel, M., Walters, W., Wan, Y., Wang, M., Warren, J., Weber, K. C., Williamson, C. H. D., Willis, A. D., Xu, Z. Z., Zaneveld, J. R., Zhang, Y., Zhu, Q., Knight, R., Caporaso, J. G. 2019. 'Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2', *Nature Biotechnology*, 37: 852-57.

Bomberg, M., Nyssönen, M., Pitkänen, P., Lehtinen, A., Itävaara, M. 2015. 'Active Microbial Communities Inhabit Sulphate-Methane Interphase in Deep Bedrock Fracture Fluids in Olkiluoto, Finland', *BioMed Research International*, 2015: 979530.

Bordenave, S., Chatterjee, I., Voordouw, G. 2013. 'Microbial community structure and microbial activities related to CO₂ storage capacities of a salt cavern', *International Biodeterioration & Biodegradation*, 81: 82-87.

Boschker, H., Nold, S., Wellsbury, P., Bos, D., de Graaf, W., Pel, R., Parkes, R. J., Cappenberg, T. E. 1998. 'Direct linking of microbial populations to specific biogeochemical processes by ¹³C-labelling of biomarkers'. *Nature* 392: 801–805

Brandt, K. K., Vester, F., Jensen, A. N., Ingvorsen, K. 2001. 'Sulfate Reduction Dynamics and Enumeration of Sulfate-Reducing Bacteria in Hypersaline Sediments of the Great Salt Lake (Utah,USA)', *Microbial Ecology*, 41: 1-11.

Bray, J. R., & Curtis, J. T. 1957. An Ordination of the Upland Forest Communities of Southern Wisconsin. *Ecological Monographs*, 27(4), 326–349.

Brown, S. D., Begemann, M. B., Mormile, M. R., Wall, J. D., Han, C. S., Goodwin, L. A., Pitluck, S., Land, M. L., Hauser, L. J., Elias, D. A. 2011. 'Complete genome sequence of the haloalkaliphilic, hydrogen-producing bacterium Halanaerobium hydrogeniformans', *J Bacteriol*, 193: 3682-3.

Bundesnetzagentur. 2022. 'Netzengpassmanagement Gesamtes Jahr 2021'.

Caglayan, D. G., Weber, N., Heinrichs, H. U., Linßen, J., Robinius, M., Kukla, P. A., Stolten, D. 2020. 'Technical potential of salt caverns for hydrogen storage in Europe', *International Journal of Hydrogen Energy*, 45: 6793-805.

- Calabrese, F., Stryhanyuk, H., Moraru, C., Schlömann, M., Wick, L. Y., Richnow, H. H., Musat, F., Musat, N. 2021. 'Metabolic history and metabolic fitness as drivers of anabolic heterogeneity in isogenic microbial populations', *Environmental Microbiology*, 23: 6764-76.
- Callahan, B. J., McMurdie, P. J., Rosen, M. J., Han, A. W., Johnson, A. J. A., Holmes, S. P. 2016. 'DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data', *Nature Methods*, 13: 581-83.
- Caporaso, J. G., Lauber, C. L., Walters, W. A., Berg-Lyons, D., Lozupone, C. A., Turnbaugh, P. J., Fierer, N., Knight, R. 2011. 'Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108: 4516-22.
- Cayol, J. L., Ollivier, B., Patel, B. K. C., Ageron, E., Grimont, P. A. D., Prensier, G., Garcia, J. L. 1996. 'Haloanaerobium lacusroseus sp nov, an extremely halophilic fermentative bacterium from the sediments of a hypersaline lake', *International Journal of Systematic Bacteriology*, 46: 628-28.
- Chaumeil, P.-A., Mussig, A. J., Hugenholtz, P., Parks, D. H. 2019. 'GTDB-Tk: a toolkit to classify genomes with the Genome Taxonomy Database', *Bioinformatics*, 36: 1925-27.
- Chikere, C. B., Okpokwasili, G. C., Chikere, B. O. 2011. 'Monitoring of microbial hydrocarbon remediation in the soil', *3 Biotech*, 1: 117-38.
- Cline, J. D. 1969. 'Spectrophotometric determination of hydrogen sulfide in natural waters', *Limnology and Oceanography*, 14: 454-58.
- Cornet, J. S., Dabrowski, M., Schmid, D. W. 2018. 'Long term creep closure of salt cavities', *International Journal of Rock Mechanics and Mining Sciences*, 103: 96-106.
- Csonka, L. N., Hanson, A. D. 1991. 'PROKARYOTIC OSMOREGULATION: Genetics and Physiology', *Annual Review of Microbiology*, 45: 569-606.
- de Campos Rodrigues, T., Rosenbaum, M. A. 2014. 'Microbial Electroreduction: Screening for New Cathodic Biocatalysts', *ChemElectroChem*, 1: 1916-22.
- Deole, R., Challacombe, J., Raiford, D. W., Hoff, W. D. 2013. 'An extremely halophilic proteobacterium combines a highly acidic proteome with a low cytoplasmic potassium content', *Journal of Biological Chemistry*, 288: 581-8.

- Dopffel, N., Jansen, S., Gerritse, J. 2021. 'Microbial side effects of underground hydrogen storage - Knowledge gaps, risks and opportunities for successful implementation', *International Journal of Hydrogen Energy*, 46: 8594-606.
- Drake, H. L., Küsel, K., Matthies, C. 2006. 'Acetogenic Prokaryotes.' in Martin Dworkin, Stanley Falkow, Eugene Rosenberg, Karl-Heinz Schleifer and Erko Stackebrandt (eds.), *The Prokaryotes: Volume 2: Ecophysiology and Biochemistry* (Springer New York: New York, NY).
- Edwards, K.J., Becker, K., Colwell, F. 2012. 'The Deep, Dark Energy Biosphere: Intraterrestrial Life on Earth', *Annual Review of Earth and Planetary Science*, 40: 551-568.
- Enning, D., Garrelfs, J. 2014. 'Corrosion of Iron by Sulfate-Reducing Bacteria: New Views of an Old Problem', *Applied and Environmental Microbiology*, 80: 1226-36.
- Fernández-Remolar, D. C., Chong-Díaz, G., Ruíz-Bermejo, M., Harir, M., Schmitt-Kopplin, P., Tziotis, D., Gómez-Ortiz, D., García-Villadangos, M., Martín-Redondo, M. P., Gómez, F., Rodríguez-Manfredi, J. A., Moreno-Paz, M., De Diego-Castilla, G., Echeverría, A., Urtuvia, V. N., Blanco, Y., Rivas, L., Izawa, M. R. M., Banerjee, N. R., Demergasso, C., Parro, V. 2013. 'Molecular preservation in halite- and perchlorate-rich hypersaline subsurface deposits in the Salar Grande basin (Atacama Desert, Chile): Implications for the search for molecular biomarkers on Mars', *Journal of Geophysical Research: Biogeosciences*, 118: 922-39.
- Fish, S. A., Shepherd, T. J., McGenity, T. J., Grant, W. D. 2002. 'Recovery of 16S ribosomal RNA gene fragments from ancient halite', *Nature*, 417: 432-36.
- Fondi, M., Rizzi, E., Emiliani, G., Orlandini, V., Berna, L., Papaleo, M. C., Perrin, E., Maida, I., Corti, G., De Bellis, G., Baldi, F., Dijkshoorn, L., Vanechoutte, M., Fani, R. 2013. 'The genome sequence of the hydrocarbon-degrading *Acinetobacter venetianus* VE-C3', *Research in Microbiology*, 164: 439-49.
- Foti, M., Sorokin, D. Y., Lomans, B., Mussman, M., Zacharova, E. E., Pimenov, N. V., Kuenen, J. G., Muyzer, G. 2007. 'Diversity, activity, and abundance of sulfate-reducing bacteria in saline and hypersaline soda lakes', *Applied and Environmental Microbiology*, 73: 2093-100.
- Foti, M. J., Sorokin, D. Y., Zacharova, E. E., Pimenov, N. V., Kuenen, J. G., Muyzer, G. 2008. 'Bacterial diversity and activity along a salinity gradient in soda lakes of the Kulunda Steppe (Altai, Russia)', *Extremophiles*, 12: 133-45.

- Fuchs, G. 2011. 'Alternative Pathways of Carbon Dioxide Fixation: Insights into the Early Evolution of Life?', *Annual Review of Microbiology*, 65: 631-58.
- Galinski, E. A. 1993. 'Compatible solutes of halophilic eubacteria: molecular principles, water-solute interaction, stress protection', *Experientia*, 49: 487-96.
- Galinski, E. A. 1995. 'Osmoadaptation in Bacteria.' in R. K. Poole (ed.), *Advances in Microbial Physiology* (Academic Press).
- Galinski, E. A., Trüper, H. G. 1982. 'Betaine, a compatible solute in the extremely halophilic phototrophic bacterium *Ectothiorhodospira halochloris*', *Fems Microbiology Letters*, 13: 357-60.
- Gantner, S., Andersson, A. F., Alonso-Saez, L., Bertilsson, S. 2011. 'Novel primers for 16S rRNA-based archaeal community analyses in environmental samples', *Journal of Microbiological Methods*, 84: 12-8.
- Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M., Appel, R., Bairoch, A. 2005. 'Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server.' in John M. Walker (ed.), *The Proteomics Protocols Handbook* (Humana Press: Totowa, NJ).
- Geluk, M. C. 2000. 'Late Permian (Zechstein) carbonate-facies maps, the Netherlands', *Netherlands Journal of Geosciences - Geologie en Mijnbouw*, 79: 17-27.
- Genderjahn, S., Alawi, M., Mangelsdorf, K., Horn, F., Wagner, D. 2018. 'Desiccation- and Saline-Tolerant Bacteria and Archaea in Kalahari Pan Sediments', *Frontiers in Microbiology*, 9: 2082.
- Gochnauer, M. B., Kushner, D. J. 1971. 'Potassium binding, growth, and survival of an extremely halophilic bacterium', *Canadian Journal of Microbiology*, 17: 17-23.
- Greening, C., Biswas, A., Carere, C. R., Jackson, C. J., Taylor, M. C., Stott, M. B., Cook, G. M., Morales, S. E. 2016. 'Genomic and metagenomic surveys of hydrogenase distribution indicate H₂ is a widely utilised energy source for microbial growth and survival', *Isme Journal*, 10: 761-77.
- Gunde-Cimerman, N., Plemenitaš, A., Oren, A. 2018. 'Strategies of adaptation of microorganisms of the three domains of life to high salt concentrations', *Fems Microbiology Reviews*, 42: 353-75.

- Gurevich, A., Saveliev, V., Vyahhi, N., Tesler, G. 2013. 'QUAST: quality assessment tool for genome assemblies', *Bioinformatics*, 29: 1072-75.
- Hauch, A., Ebbesen, S. D., Jensen, S. H., Mogensen, M. 2008. 'Highly efficient high temperature electrolysis', *Journal of Materials Chemistry*, 18: 2331-40.
- Humez, P., Mayer, B., Nightingale, M., Ing, J., Becker, V., Jones, D., Lam, V. 2016. 'An 8-year record of gas geochemistry and isotopic composition of methane during baseline sampling at a groundwater observation well in Alberta (Canada)', *Hydrogeology Journal*, 24: 109-122
- IPA, F. I. f. P. u. A. 2022. 'Elektrolyseure sollen Massenware werden'.
- Ivanova, N., Sikorski, J., Chertkov, O., Nolan, M., Lucas, S., Hammon, N., Deshpande, S., Cheng, J. F., Tapia, R., Han, C., Goodwin, L., Pitluck, S., Huntemann, M., Liolios, K., Pagani, I., Mavromatis, K., Ovchinikova, G., Pati, A., Chen, A., Palaniappan, K., Land, M., Hauser, L., Brambilla, E. M., Kannan, K. P., Rohde, M., Tindall, B. J., Goker, M., Detter, J. C., Woyke, T., Bristow, J., Eisen, J. A., Markowitz, V., Hugenholtz, P., Kyrpides, N. C., Klenk, H. P., Lapidus, A. 2011. 'Complete genome sequence of the extremely halophilic *Halanaerobium praevalens* type strain (GSL(T))', *Standards in Genomic Sciences*, 4: 312-21.
- Itävaara, M., Nyysönen, M., Kapanen, A., Nousiainen, A., Ahonen, L., Kukkonen, I. 2011. 'Characterization of bacterial diversity to a depth of 1500 m in the Outokumpu deep borehole, Fennoscandian Shield', *FEMS Microbiology Ecology*, 77: 295–309.
- Jakobsen, T. F., Kjeldsen, K. U., Ingvorsen, K. 2006. '*Desulfohalobium utahense* sp. nov., a moderately halophilic, sulfate-reducing bacterium isolated from Great Salt Lake', *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56: 2063-69.
- Jakus, N., Mellage, A., Höschen, C., Maisch, M., Byrne, J. M., Mueller, C. W., Grathwohl, P., Kappler, A. 2021. 'Anaerobic Neutrophilic Pyrite Oxidation by a Chemolithoautotrophic Nitrate-Reducing Iron(II)-Oxidizing Culture Enriched from a Fractured Aquifer', *Environmental Science & Technology*, 55:14, 9876-9884
- Jenyon, M. K. 1986. 'Halite rheology: Salt with a pinch of water', *Nature*, 324: 515-16.
- Jones, B. E., Grant, W. D., Duckworth, A. W., Owenson, G. G. 1998. 'Microbial diversity of soda lakes', *Extremophiles*, 2: 191-200.

- Jørgensen, B. B., Kasten, S. 2006. 'Sulfur Cycling and Methane Oxidation.' in Horst D. Schulz and Matthias Zabel (eds.), *Marine Geochemistry* (Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg).
- Kang, D. D., Li, F., Kirton, E., Thomas, A., Egan, R., An, H., Wang, Z. 2019. 'MetaBAT 2: an adaptive binning algorithm for robust and efficient genome reconstruction from metagenome assemblies', *PeerJ*, 7: e7359.
- Kapuscinski, J. 1995. 'DAPI: a DNA-Specific Fluorescent Probe'. *Biotechnic & Histochemistry*, 70(5), 220–233.
- Kerker, S., Bharathi, P. A. L. 2007. 'Stimulation of sulfate-reducing activity at salt-saturation in the salterns of Ribandar, Goa, India', *Geomicrobiology Journal*, 24: 101-10.
- Klindworth, A., Pruesse, E., Schweer, T., Peplies, J., Quast, C., Horn, M., Glöckner, F. O. 2013. 'Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies', *Nucleic acids research*, 41: e1-e1.
- Koch, C., Harnisch, F. 2016. 'Is there a Specific Ecological Niche for Electroactive Microorganisms?', *ChemElectroChem*, 3: 1282-95.
- Kohlhepp B., Lehmann R., Seeber P., Küsel K., Trumbore S. E., Totsche K. U. 2017. 'Aquifer configuration and geostructural links control the groundwater quality in thin-bedded carbonate-siliciclastic alternations of the Hainich CZE, central Germany'. *Hydrology and Earth System Sciences*, 21: 6091-6116.
- Kopf, S. H., McGlynn, S. E., Green-Saxena, A., Guan, Y., Newman, D. K., Orphan, V. J. 2015. 'Heavy water and ¹⁵N labelling with NanoSIMS analysis reveals growth rate-dependent metabolic heterogeneity in chemostats', *Environmental Microbiology*, 17: 2542-56.
- Kremp, F., Roth, J., Müller, V. 2022. 'A Third Way of Energy Conservation in Acetogenic Bacteria', *Microbiology Spectrum*, 10: e01385-22.
- Krüger, F. 2012. 'Trim Galore: Available online at: https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/trim_galore/'.
- Kuever, J. 2014. 'The Family Desulfohalobiaceae.' in Eugene Rosenberg, Edward F. DeLong, Stephen Lory, Erko Stackebrandt and Fabiano Thompson (eds.), *The Prokaryotes*:

Deltaproteobacteria and Epsilonproteobacteria (Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg).

Kulp, T. R., Han, S., Saltikov, C. W., Lanoil, B. D., Zargar, K., Oremland, R. S. 2007. 'Effects of imposed salinity gradients on dissimilatory arsenate reduction, sulfate reduction, and other microbial processes in sediments from two California soda lakes', *Applied and Environmental Microbiology*, 73: 5130-37.

Kulp, T. R., Hoefft, S. E., Miller, L. G., Saltikov, C., Murphy, J. N., Han, S., Lanoil, B., Oremland, R. S. 2006. 'Dissimilatory Arsenate and Sulfate Reduction in Sediments of Two Hypersaline, Arsenic-Rich Soda Lakes: Mono and Searles Lakes, California', *Applied and Environmental Microbiology*, 72: 6514-26.

Kurth, J. M., Op den Camp, H. J. M., Welte, C. U. 2020. 'Several ways one goal—methanogenesis from unconventional substrates', *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104: 6839-54.

Kuypers, M.M.M., Jørgensen, B.B. 2007. 'The future of single-cell environmental microbiology'. *Environmental Microbiology*, 9: 6-7.

L'Haridon, S., Haroun, H., Corre, E., Roussel, E., Chalopin, M., Pignet, P., Balière, C., la Cono, V., Jebbar, M., Yakimov, M., Toffin, L. 2020. 'Methanohalophilus profundus sp. nov., a methylotrophic halophilic piezophilic methanogen isolated from a deep hypersaline anoxic basin', *Systematic and Applied Microbiology*, 43: 126107.

Lemaire, O. N., Jespersen, M., Wagner, T. 2020. 'CO₂-Fixation Strategies in Energy Extremophiles: What Can We Learn From Acetogens?', *Frontiers in Microbiology*, 11.

Li, K., Liu, J., Grovenor, C. R. M., Moore, K. L. 2020. 'NanoSIMS Imaging and Analysis in Materials Science', *Annual Review of Analytical Chemistry*, 13: 273-92.

Liang, R., Davidova, I. A., Marks, C. R., Stamps, B. W., Harriman, B. H., Stevenson, B. S., Duncan, K. E., Suflita, J. M. 2016. 'Metabolic Capability of a Predominant Halanaerobium sp. in Hydraulically Fractured Gas Wells and Its Implication in Pipeline Corrosion', *Frontiers in Microbiology*, 7.

Ljungdahl, L. G. 1969. 'Total synthesis of acetate from CO₂ by heterotrophic bacteria', *Annu Rev Microbiol*, 23: 515-38.

- Löffler, M., Kümmel, S., Vogt, C., Richnow, H. H. 2019. 'H₂ Kinetic Isotope Fractionation Superimposed by Equilibrium Isotope Fractionation During Hydrogenase Activity of *D. vulgaris* Strain Miyazaki', *Front Microbiol*, 10: 1545.
- Logan, B. E., Rossi, R., Ragab, A. a., Saikaly, P. E. 2019. 'Electroactive microorganisms in bioelectrochemical systems', *Nature Reviews Microbiology*, 17: 307-19.
- Lopez-Fernandez, M., Simone, D., Wu, X., Soler, L., Nilsson, E., Holmfeldt, K., Lantz, H., Bertilsson, S., Dopson, M. 2018a. 'Metatranscriptomes Reveal That All Three Domains of Life Are Active but Are Dominated by Bacteria in the Fennoscandian Crystalline Granitic Continental Deep Biosphere', *Applied and Environmental Science*, mBio 9:e01792-18.
- Lopez-Fernandez, M., Broman, E., Turner, S., Wu, X., Bertilsson, S., Dopson, M. 2018b. 'Investigation of viable taxa in the deep terrestrial biosphere suggests high rates of nutrient recycling', *FEMS Microbiology Ecology*, 94: 8.
- Lopez-Lopez, A., Yarza, P., Richter, M., Suarez-Suarez, A., Anton, J., Niemann, H., Rossello-Mora, R. 2010. 'Extremely halophilic microbial communities in anaerobic sediments from a solar saltern', *Environmental Microbiology Reports*, 2: 258-71.
- Lovley, D. R. 2012. 'Electromicrobiology', *Annual Review of Microbiology*, 66: 391-409.
- Lux, K. H. 2009. "Design of salt caverns for the storage of natural gas, crude oil and compressed air: Geomechanical aspects of construction, operation and abandonment." In *Underground Gas Storage: Worldwide Experiences and Future Development in the UK and Europe*, edited by D. J. Evans and R. A. Chadwick, 0. Geological Society of London.
- Madigan, M., Sattley, W., Bender, K., Stahl, D., Buckley, D. 2018. "Brock Biology of Microorganisms: Global Edition." In.: Pearson International.
- Magnabosco, C., Lin, L. H., Dong, H., Bomberg, M., Ghiorse, W., Stan-Lotter, H., Pedersen, K., Kieft, T. L., van Heerden, E., Onstott, T. C. 2018. 'The biomass and biodiversity of the continental subsurface'. *Nature Geoscience*, 11: 707–717.
- Magnabosco, C., Ryan, K., Lau, M. C. Y., Kuloyo, O., Sherwood Lollar, B., Kieft, T. L., van Heerden, E., Onstott, T. C. 2016. 'A metagenomic window into carbon metabolism at 3 km depth in Precambrian continental crust', *ISME Journal*, 10: 730–741

- Maher, N., Dillon, H. K., Vermund, S. H., Unnasch, T. R. 2001. 'Magnetic Bead Capture Eliminates PCR Inhibitors in Samples Collected from the Airborne Environment, Permitting Detection of *Pneumocystis carinii* DNA', *Applied and Environmental Microbiology*, 67: 449-52.
- Martin, M. 2011. 'Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads', *EMBnet.journal*, 17: 3.
- Matos, C. R., Carneiro, J. F., Silva, P. P. 2019. 'Overview of Large-Scale Underground Energy Storage Technologies for Integration of Renewable Energies and Criteria for Reservoir Identification', *Journal of Energy Storage*, 21: 241-58.
- McMurdie, P. J., Holmes, S. 2013. 'phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data', *Plos One*, 8: 11.
- Mehrshad, M., Lopez-Fernandez, M., Sundh, J., Bell, E., Simone, D., Buck, M., Bernier-Latmani, R., Bertilsson, S., Dopson, M. 2021. 'Energy efficiency and biological interactions define the core microbiome of deep oligotrophic groundwater', *Nature Communications*, 12: 4253.
- Meyer, N. R., Morono, Y., Dekas, A. E. 2024. 'Single-cell analysis reveals an active and heterotrophic microbiome in the Guaymas Basin deep subsurface with significant inorganic carbon fixation by heterotrophs', *Applied and Environmental Microbiology*, e00446-24.
- Milucka, J., Ferdelman, T. G., Polerecky, L., Franzke, D., Wegener, G., Schmid, M., Lieberwirth, I., Wagner, M., Widdel, F., Kuypers, M. M. M. 2012. 'Zero-valent sulphur is a key intermediate in marine methane oxidation', *Nature*, 491: 541-46.
- Mitchell, P. 1961. 'Coupling of Phosphorylation to Electron and Hydrogen Transfer by a Chemi-Osmotic type of Mechanism', *Nature*, 191: 144-48.
- Mormile, M. R., Biesen, M. A., Gutierrez, M. C., Ventosa, A., Pavlovich, J. B., Onstott, T. C., and Fredrickson, J. K. 2003. 'Isolation of *Halobacterium salinarum* retrieved directly from halite brine inclusions', *Environmental Microbiology*, 5: 1094-102.
- Morono Y., Wishart, J. R. , Ito, M., Ijiri, A., Hoshino, T., Torres, M., Verba, C., Terada, T., Inagaki, F., Colwell, F. S. 2019. 'Microbial Metabolism and Community Dynamics in Hydraulic

Fracturing Fluids Recovered From Deep Hydrocarbon-Rich Shale', *Frontiers in Microbiology*, 10:376.

Morozova, D., Let, D., Würdemann, H. 2013. 'Analysis of the Microbial Community from a Saline Aquifer Prior to CO₂ Injection in Ketzin Using Improved Fluorescence in situ Hybridisation Method', *Energy Procedia*, 40: 276-84.

Mullakhanbhai, M. F., Larsen, H. 1975. 'Halobacterium volcanii spec. nov., a Dead Sea halobacterium with a moderate salt requirement', *Archives of Microbiology*, 104: 207-14.

Müller, V. 2003. 'Energy conservation in acetogenic bacteria', *Appl Environ Microbiol*, 69: 6345-53.

Musat, N., Foster, R., Vagner, T., Adam, B., Kuypers, M. M. 2012. 'Detecting metabolic activities in single cells, with emphasis on nanoSIMS', *FEMS Microbiol Rev*, 36: 486-511.

Musat, N., Halm, H., Winterholler, B., Hoppe, P., Peduzzi, S., Hillion, F., Horreard, F., Amann, R., Jørgensen, B. B., Kuypers, M. M. 2008. 'A single-cell view on the ecophysiology of anaerobic phototrophic bacteria'. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(46):17861-6.

Musat, N., Musat, F., Weber, P. K., Pett-Ridge, J. 2016. 'Tracking microbial interactions with NanoSIMS', *Curr Opin Biotechnol*, 41: 114-21.

Nurk, S., Meleshko, D., Korobeynikov, A., Pevzner, P. A. 2017. 'metaSPAdes: a new versatile metagenomic assembler', *Genome Research*, 27: 824-34.

Ollivier, B., Hatchikian, C. E., Prensier, G., Guezennec, J., Garcia, J.-L. 1991. 'Desulfohalobium retbaense gen. nov., sp. nov., a Halophilic Sulfate-Reducing Bacterium from Sediments of a Hypersaline Lake in Senegal', *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 41: 74-81.

Oren, A. 1999. 'Bioenergetic aspects of halophilism', *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 63: 334.

Oren, A. 2006. 'Life at High Salt Concentrations.' in Martin Dworkin, Stanley Falkow, Eugene Rosenberg, Karl-Heinz Schleifer and Erko Stackebrandt (eds.), *The Prokaryotes* (Springer New York: New York, NY).

- Oren, A. 2011. 'Thermodynamic limits to microbial life at high salt concentrations', *Environ Microbiol*, 13: 1908-23.
- Oren, A. 2013. 'Life at high salt concentrations, intracellular KCl concentrations, and acidic proteomes', *Frontiers in Microbiology*, 4.
- Oren, A. 2014. 'The Order Halanaerobiales, and the Families Halanaerobiaceae and Halobacteroidaceae.' in Eugene Rosenberg, Edward F. DeLong, Stephen Lory, Erko Stackebrandt and Fabiano Thompson (eds.), *The Prokaryotes: Firmicutes and Tenericutes* (Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg).
- Oren, A., Arahai, D. R., Ventosa, A. 2009. 'Emended descriptions of genera of the family Halobacteriaceae', *Int J Syst Evol Microbiol*, 59: 637-42.
- Orphan, V.J., House, C.H. 2009. 'Geobiological investigations using secondary ion mass spectrometry: microanalysis of extant and paleo-microbial processes', *Geobiology*, 7: 360-372
- Osburn, M. R., LaRowe, D. E., Momper, L. M., Amend, J. P. 2014. 'Chemolithotrophy in the continental deep subsurface: Sanford Underground Research Facility (SURF), USA'. *Frontiers in Microbiology*, 5: 610
- Pace, N. R. 1997. 'A Molecular View of Microbial Diversity and the Biosphere', *Science*, 276: 734-40.
- Parks DH, Imelfort M, Skennerton CT, Hugenholtz P, Tyson GW. 2014. Assessing the quality of microbial genomes recovered from isolates, single cells, and metagenomes. *Genome Research*, 25: 1043-1055.
- Pedersen, K. 2013. 'Metabolic activity of subterranean microbial communities in deep granitic groundwater supplemented with methane and H₂', *The ISME Journal*, 7: 839–849.
- Pérez, E., and Chebude, Y. 2017. 'Chemical Analysis of Gaet'ale, a Hypersaline Pond in Danakil Depression (Ethiopia): New Record for the Most Saline Water Body on Earth', *Aquatic Geochemistry*, 23: 109-17.
- Polerecky, L., Adam, B., Milucka, J., Musat, N., Vagner, T., Kuypers, M. M. 2012. 'Look@NanoSIMS--a tool for the analysis of nanoSIMS data in environmental microbiology', *Environ Microbiol*, 14: 1009-23.

- Price, M. N., Dehal, P. S., Arkin, A. P. 2010. 'FastTree 2 – Approximately Maximum-Likelihood Trees for Large Alignments', *PLoS One*, 5(3): e9490.
- Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., Peplies, J., Glöckner, F. O. 2012. 'The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools', *Nucleic acids research*, 41: D590-D96.
- Rabus, R., Venceslau, S. S., Wohlbrand, L., Voordouw, G., Wall, J. D., Pereira, I. A. 2015. 'A Post-Genomic View of the Ecophysiology, Catabolism and Biotechnological Relevance of Sulphate-Reducing Prokaryotes', *Adv Microb Physiol*, 66: 55-321.
- Ranchou-Peyruse, M., Guignard, M., Casteran, F., Abadie, M., Defois, C., Peyret, P., Dequidt, D., Caumette, G., Chiquet, P., Cézac, P., Ranchou-Peyruse, A. 2021. 'Microbial Diversity Under the Influence of Natural Gas Storage in a Deep Aquifer', *Frontiers in Microbiology*, 12.
- Reistad, R. 1970. 'On the composition and nature of the bulk protein of extremely halophilic bacteria', *Arch Mikrobiol*, 71: 353-60.
- Rengpipat, S., Lowe, S. E., Zeikus, J. G. 1988. 'Effect of extreme salt concentrations on the physiology and biochemistry of Halobacteroides acetoethylicus', *J Bacteriol*, 170: 3065-71.
- Roberts, M. F. 2005. 'Organic compatible solutes of halotolerant and halophilic microorganisms', *Saline systems*, 1: 5.
- Rossi, M., Pollock, W. B., Reij, M. W., Keon, R. G., Fu, R., Voordouw, G. 1993. 'The hmc operon of Desulfovibrio vulgaris subsp. vulgaris Hildenborough encodes a potential transmembrane redox protein complex', *J Bacteriol*, 175: 4699-711.
- Sankaranarayanan, K., Timofeeff, M. N., Spathis, R., Lowenstein, T. K., Lum, J. K. 2011. 'Ancient microbes from halite fluid inclusions: optimized surface sterilization and DNA extraction', *Plos One*, 6: e20683-e83.
- Santos, A. M. D., Costa, J. M., Braga, J. K., Flynn, T. M., Brucha, G., Sancinetti, G. P., Rodriguez, R. P. 2022. 'Lactate as an effective electron donor in the sulfate reduction: impacts on the microbial diversity', *Environ Technol*, 43: 3149-60.
- Schalenbach, M., Kasian, O., and Mayrhofer, K. J. J. 2018. 'An alkaline water electrolyzer with nickel electrodes enables efficient high current density operation', *International Journal of Hydrogen Energy*, 43: 11932-38.

- Schauder, R., Widdel, F., Fuchs, G. 1987. 'Carbon assimilation pathways in sulfate-reducing bacteria II. Enzymes of a reductive citric acid cycle in the autotrophic *Desulfobacter hydrogenophilus*', *Archives of Microbiology*, 148: 218-25.
- Schoelmerich, M. C., Müller, V. 2019. 'Energy conservation by a hydrogenase-dependent chemiosmotic mechanism in an ancient metabolic pathway', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116: 6329-34.
- Schubert, B. A., Lowenstein, T. K., Timofeeff, M. N., Parker, M. A. 2010. 'Halophilic Archaea cultured from ancient halite, Death Valley, California', *Environmental Microbiology*, 12: 440-54.
- Schuchmann, K., Müller, V. 2014. 'Autotrophy at the thermodynamic limit of life: a model for energy conservation in acetogenic bacteria', *Nature Reviews Microbiology*, 12: 809-21.
- Schulz, S., Iglesias-Cans, M., Krah, A., Yildiz, Ö., Leone, V., Matthies, D., Cook, G. M., Faraldo-Gómez, J. D., Meier, T. 2013. 'A New Type of Na⁺-Driven ATP Synthase Membrane Rotor with a Two-Carboxylate Ion-Coupling Motif', *PLOS Biology*, 11: e1001596.
- Schwab, L., Popp, D., Nowack, G., Bombach, P., Vogt, C., Richnow, H. H. 2022. 'Structural analysis of microbiomes from salt caverns used for underground gas storage', *International Journal of Hydrogen Energy*.
- Schwartz, E., and Friedrich, B. 2006. 'The H₂-Metabolizing Prokaryotes.' in Martin Dworkin, Stanley Falkow, Eugene Rosenberg, Karl-Heinz Schleifer and Erko Stackebrandt (eds.), *The Prokaryotes: Volume 2: Ecophysiology and Biochemistry* (Springer New York: New York, NY).
- Sedlacek, R. 2009. 'Underground gas storage in Germany', *Erdöl Erdgas Kohle*, 125: 412-26.
- Sessions, A. L., Burgoyne, T. W., Schimmelmann, A., Hayes, J. M. 1999. 'Fractionation of hydrogen isotopes in lipid biosynthesis', *Organic Geochemistry*, 30: 1193-200.
- Shaffer, M., Borton, M. A., McGivern, B. B., Zayed, A. A., La Rosa, Sabina L., Solden, L. M., Liu, P., Narrowe, A. B., Rodríguez-Ramos, J., Bolduc, B., Gazitúa, M. C., Daly, R. A., Smith, G. J., Vik, D. R., Pope, P. B., Sullivan, M. B., Roux, S., Wrighton, Kelly C. 2020. 'DRAM for distilling microbial metabolism to automate the curation of microbiome function', *Nucleic acids research*, 48: 8883-900.
- Shetty, S. A., Lahti, L. 2019. 'Microbiome data science', *Journal of Biosciences*, 44: 6.

Siegbahn, P. E. M., Liao, R.-Z. 2020. 'The Energetics of Hydrogen Molecule Oxidation in NiFe-hydrogenase', *ACS Catalysis*, 10: 5603-13.

Sikorski, J., Lapidus, A., Chertkov, O., Lucas, S., Copeland, A., Glavina Del Rio, T., Nolan, M., Tice, H., Cheng, J. F., Han, C., Brambilla, E., Pitluck, S., Liolios, K., Ivanova, N., Mavromatis, K., Mikhailova, N., Pati, A., Bruce, D., Detter, C., Tapia, R., Goodwin, L., Chen, A., Palaniappan, K., Land, M., Hauser, L., Chang, Y. J., Jeffries, C. D., Rohde, M., Göker, M., Spring, S., Woyke, T., Bristow, J., Eisen, J. A., Markowitz, V., Hugenholtz, P., Kyrpides, N. C., Klenk, H. P. 2010. 'Complete genome sequence of *Acetohalobium arabaticum* type strain (Z-7288)', *Stand Genomic Sci*, 3: 57-65.

Slodzian, G., Wu, T.-D., Bardin, N., Duprat, J., Engrand, C., Guerquin-Kern, J.-L. 2014. 'Simultaneous Hydrogen and Heavier Element Isotopic Ratio Images with a Scanning Submicron Ion Probe and Mass Resolved Polyatomic Ions', *Microscopy and Microanalysis*, 20: 577-81.

Song, W.-Z., Thomas, T. 2017. 'Binning_refiner: improving genome bins through the combination of different binning programs', *Bioinformatics*, 33: 1873-75.

Sorokin, D. Y., Abbas, B., Tourova, T. P., Bumazhkin, B. K., Kolganova, T. V., Muyzer, G. 2014a. 'Sulfate-dependent acetate oxidation under extremely natron-alkaline conditions by syntrophic associations from hypersaline soda lakes', *Microbiology-Sgm*, 160: 723-32.

Sorokin, D. Y., Banciu, H. L., Muyzer, G. 2015a. 'Functional microbiology of soda lakes', *Curr Opin Microbiol*, 25: 88-96.

Sorokin, D. Y., Berben, T., Melton, E. D., Overmars, L., Vavourakis, C. D., Muyzer, G. 2014b. 'Microbial diversity and biogeochemical cycling in soda lakes', *Extremophiles*, 18: 791-809.

Sorokin, D. Y., Chernyh, N. A. 2017. 'Desulfonatronospira sulfatiphila sp nov., and Desulfitispora elongata sp nov., two novel haloalkaliphilic sulfidogenic bacteria from soda lakes', *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 67: 396-401.

Sorokin, D. Y., Chernyh, N. A., Poroshina, M. N. 2015b. 'Desulfonatronobacter acetoxydans sp nov.: a first acetate-oxidizing, extremely salt-tolerant alkaliphilic SRB from a hypersaline soda lake', *Extremophiles*, 19: 899-907.

- Sorokin, D. Y., Detkova, E. N., Muyzer, G. 2010a. 'Propionate and butyrate dependent bacterial sulfate reduction at extremely haloalkaline conditions and description of *Desulfobotulus alkaliphilus* sp nov', *Extremophiles*, 14: 71-77.
- Sorokin, D. Y., Kuenen, J. G., Muyzer, G. 2011a. 'The microbial sulfur cycle at extremely haloalkaline conditions of soda lakes', *Frontiers in Microbiology*, 2.
- Sorokin, D. Y., Makarova, K. S., Abbas, B., Ferrer, M., Golyshin, P. N., Galinski, E. A., Ciordia, S., Mena, M. C., Merkel, A. Y., Wolf, Y. I., van Loosdrecht, M. C. M., Koonin, E. V. 2017a. 'Discovery of extremely halophilic, methyl-reducing euryarchaea provides insights into the evolutionary origin of methanogenesis', *Nature Microbiology*, 2.
- Sorokin, D. Y., Messina, E., Smedile, F., Roman, P., Damsté, J. S. S., Ciordia, S., Mena, M. C., Ferrer, M., Golyshin, P. N., Kublanov, I. V., Samarov, N. I., Toshchakov, S. V., La Cono, V., Yakimov, M. M. 2017b. 'Discovery of anaerobic lithoheterotrophic haloarchaea, ubiquitous in hypersaline habitats', *The ISME Journal*, 11: 1245-60.
- Sorokin, D. Y., Muyzer, G. 2010. 'Haloalkaliphilic spore-forming sulfidogens from soda lake sediments and description of *Desulfitispora alkaliphila* gen. nov., sp nov', *Extremophiles*, 14: 313-20.
- Sorokin, D. Y., Rusanov, I., Pimenov, N. V., Tourova, T. P., Abbas, B., Muyzer, G. 2010b. 'Sulfidogenesis under extremely haloalkaline conditions in soda lakes of Kulunda Steppe (Altai, Russia)', *Fems Microbiology Ecology*, 73: 278-90.
- Sorokin, D. Y., Tourova, T. P., Abbas, B., Suhacheva, M. V., Muyzer, G. 2012a. 'Desulfonatrovibrio halophilus sp nov., a novel moderately halophilic sulfate-reducing bacterium from hypersaline chloride-sulfate lakes in Central Asia', *Extremophiles*, 16: 411-17.
- Sorokin, D. Y., Tourova, T. P., Henstra, A. M., Stams, A. J., Galinski, E. A., Muyzer, G. 2008. 'Sulfidogenesis under extremely haloalkaline conditions by *Desulfonatrosipira thiodismutans* gen. nov., sp. nov., and *Desulfonatrosipira delicata* sp. nov. - a novel lineage of Deltaproteobacteria from hypersaline soda lakes', *Microbiology*, 154: 1444-53.
- Sorokin, D. Y., Tourova, T. P., Kolganova, T. V., Detkova, E. N., Galinski, E. A., Muyzer, G. 2011b. 'Culturable diversity of lithotrophic haloalkaliphilic sulfate-reducing bacteria in soda lakes and the description of *Desulfonatronum thioautotrophicum* sp. nov., *Desulfonatronum*

- thiosulfatophilum sp. nov., Desulfonatronovibrio thiodismutans sp. nov., and Desulfonatronovibrio magnus sp. nov', *Extremophiles*, 15: 391-401.
- Sorokin, D. Y., Tourova, T. P., Lysenko, A. M., Muyzer, G. 2006. 'Diversity of culturable halophilic sulfur-oxidizing bacteria in hypersaline habitats', *Microbiology-Sgm*, 152: 3013-23.
- Sorokin, D. Y., Tourova, T. P., Panteleeva, A. N., Muyzer, G. 2012b. 'Desulfonatrobacter acidivorans gen. nov., sp nov and Desulfobulbus alkaliphilus sp nov., haloalkaliphilic heterotrophic sulfate-reducing bacteria from soda lakes', *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 62: 2107-13.
- Sorokin, D. Y., Tourova, T. P., Sjollem, K. A., Kuenen, J. G. 2003. 'Thialkalivibrio nitratireducens sp. nov., a nitrate-reducing member of an autotrophic denitrifying consortium from a soda lake', *Int J Syst Evol Microbiol*, 53: 1779-83.
- Sorokin, D. Y., Zacharova, E. E., Pimenov, N. V., Tourova, T. P., Panteleeva, A. N., Muyzer, G. 2012c. 'Sulfidogenesis in hypersaline chloride-sulfate lakes of Kulunda Steppe (Altai, Russia)', *Fems Microbiology Ecology*, 79: 445-53.
- Staley, J. T., Konopka, A. 1985. 'Measurement of in situ activities of nonphotosynthetic microorganisms in aquatic and terrestrial habitats', *Annu Rev Microbiol*, 39: 321-46.
- Struchtemeyer, C. G., Elshahed, M. S., Duncan, K. E., McInerney, M. J. 2005. 'Evidence for Aceticlastic Methanogenesis in the Presence of Sulfate in a Gas Condensate-Contaminated Aquifer', *Applied and Environmental Microbiology*, 71: 5348-53.
- Sundberg, C., Al-Soud, W. A., Larsson, M., Alm, E., Yekta, S. S., Svensson, B. H., Sørensen, S. J., Karlsson, A. 2013. '454 pyrosequencing analyses of bacterial and archaeal richness in 21 full-scale biogas digesters', *Fems Microbiology Ecology*, 85: 612-26.
- Sunfire. 2022. 'Sunfire HyLink Alkaline'.
- Tamisier, M., Schmidt, M., Vogt, C., Kümmel, S., Stryhanyuk, H., Musat, N., Richnow, H.-H., Musat, F. 2022. 'Iron corrosion by methanogenic archaea characterized by stable isotope effects and crust mineralogy', *Environmental Microbiology*, 24: 583-95.
- Tang, H. Y., Holmes, D. E., Ueki, T., Palacios, P. A., Lovley, D. R. 2019. 'Iron Corrosion via Direct Metal-Microbe Electron Transfer', *mBio*, 10.

- Tarkowski, R. 2019. 'Underground hydrogen storage: Characteristics and prospects', *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 105: 86-94.
- Tarkowski, R., Uliasaz-Misiak, B. 2021. 'Use of underground space for the storage of selected gases (CH₄, H₂, and CO₂) - possible conflicts of interest', *Gospodarka Surowcami Mineralnymi-Mineral Resources Management*, 37: 141-60.
- Taubert, M., Stockel, S., Geesink, P., Girnus, S., Jehmlich, N., von Bergen, M., Rosch, P., Popp, J., Kusel, K. 2018. 'Tracking active groundwater microbes with D₂ O labelling to understand their ecosystem function', *Environ Microbiol*, 20: 369-84.
- Teske, A., Lizarralde, D., Höfig, T.W., Aiello, I.W., Ash, J.L., Bojanova, D.P., Buatier, M.D., Edgcomb, V.P., Galerne, C.Y., Gontharet, S., Heuer, V.B., Jiang, S., Kars, M.A.C., Khogenkumar Singh, S., Kim, J.-H., Koornneef, L.M.T., Marsaglia, K.M., Meyer, N.R., Morono, Y., Negrete-Aranda, R., Neumann, F., Pastor, L.C., Peña-Salinas, M.E., Pérez Cruz, L.L., Ran, L., Riboulleau, A., Sarao, J.A., Schubert, F., Stock, J.M., Toffin, L.M.A.A., Xie, W., Yamanaka, T., Zhuang, G. 2021. 'Expedition 385 summary', *Proceedings of the International Ocean Discovery Program*, 385
- Thauer, R. K., Jungermann, K., Decker, K. 1977. 'Energy conservation in chemotrophic anaerobic bacteria', *Bacteriol Rev*, 41: 100-80.
- Thauer, R. K., Klein, A. R., Hartmann, G. C. 1996. 'Reactions with Molecular Hydrogen in Microorganisms: Evidence for a Purely Organic Hydrogenation Catalyst', *Chemical Reviews*, 96: 3031-42.
- Trembath-Reichert, E., Butterfield, D. A., Huber, J. A. 2019. 'Active seafloor microbial communities from Mariana back-arc venting fluids share metabolic strategies across different thermal niches and taxa', *The ISME Journal*, 13:9
- Trembath-Reichert, E., Morono, Y., Ijiri, A., Hoshino, T., Dawson, K. S., Inagaki, F., Orphan, V. J. 2017. Methyl-compound use and slow growth characterize microbial life in 2-km-deep seafloor coal and shale beds, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114 : 44.
- Uritskiy, G. V., DiRuggiero, J., Taylor, J. 2018. 'MetaWRAP—a flexible pipeline for genome-resolved metagenomic data analysis', *Microbiome*, 6: 158.

- Van Stempvoort, D. R., Millar, K., and Lawrence, J. R. 2009. 'Accumulation of short-chain fatty acids in an aquitard linked to anaerobic biodegradation of petroleum hydrocarbons', *Applied Geochemistry*, 24: 77-85.
- Vauclare, P., Marty, V., Fabiani, E., Martinez, N., Jasnin, M., Gabel, F., Peters, J., Zaccai, G., Franzetti, B. 2015. 'Molecular adaptation and salt stress response of Halobacterium salinarum cells revealed by neutron spectroscopy', *Extremophiles*, 19: 1099-107.
- Vauclare, P., Natali, F., Kleman, J. P., Zaccai, G., Franzetti, B. 2020. 'Surviving salt fluctuations: stress and recovery in Halobacterium salinarum, an extreme halophilic Archaeon', *Scientific Reports*, 10: 3298.
- Vavourakis, C. D., Ghai, R., Rodriguez-Valera, F., Sorokin, D. Y., Tringe, S. G., Hugenholtz, P., Muyzer, G. 2016. 'Metagenomic Insights into the Uncultured Diversity and Physiology of Microbes in Four Hypersaline Soda Lake Brines', *Frontiers in Microbiology*, 7.
- Venzlaff, H., Enning, D., Srinivasan, J., Mayrhofer, K. J. J., Hassel, A. W., Widdel, F., Stratmann, M. 2013. 'Accelerated cathodic reaction in microbial corrosion of iron due to direct electron uptake by sulfate-reducing bacteria', *Corrosion Science*, 66: 88-96.
- Vignais, P. M., Billoud, B. 2007. 'Occurrence, classification, and biological function of hydrogenases: An overview', *Chemical Reviews*, 107: 4206-72.
- Vignais, P. M., Billoud, B., Meyer, J. 2001. 'Classification and phylogeny of hydrogenases', *Fems Microbiology Reviews*, 25: 455-501.
- Vreeland, R. H., Litchfield, C. D., Martin, E. L., Elliot, E. 1980. 'Halomonas elongata, a New Genus and Species of Extremely Salt-Tolerant Bacteria', *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 30: 485-95.
- Wainø, M., Tindall, B. J., Ingvorsen, K. 2000. 'Halorhabdus utahensis gen. nov., sp. nov., an aerobic, extremely halophilic member of the Archaea from Great Salt Lake, Utah', *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50: 183-90.
- Weides, S., Moeck, I., Majorowicz, J., Palombi, D., Grobe, M. 2013. 'Geothermal exploration of Paleozoic formations in Central Alberta', *Canadian Journal of Earth Sciences*, 50: 519-34.

- Welsh, D. T., Lindsay, Y. E., Caumette, P., Herbert, R. A., Hannan, J. 1996. 'Identification of trehalose and glycine betaine as compatible solutes in the moderately halophilic sulfate reducing bacterium, *Desulfovibrio halophilus*', *Fems Microbiology Letters*, 140: 203-07.
- Whatmore, A. M., Reed, R. H. 1990. 'Determination of turgor pressure in *Bacillus subtilis*: a possible role for K⁺ in turgor regulation', *Microbiology*, 136: 2521-26.
- Whitman, W.B., Coleman, D. C., Wiebe, W.J. 1998. 'Prokaryotes: The unseen majority', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95: 6578-83.
- Widdel, F. 1980. 'Anaerober Abbau von Fettsäuren und Benzoesäure durch neu isolierte Arten Sulfat-reduzierender Bakterien.', Dissertation, Universität Göttingen.
- Widdel, F., Kohring, G.-W., Mayer, F. 1983. 'Studies on dissimilatory sulfate-reducing bacteria that decompose fatty acids', *Archives of Microbiology*, 134: 286-94.
- Widdel, F., Pfennig, N. 1981. 'Studies on dissimilatory sulfate-reducing bacteria that decompose fatty acids. I. Isolation of new sulfate-reducing bacteria enriched with acetate from saline environments. Description of *Desulfobacter postgatei* gen. nov., sp. nov', *Arch Microbiol*, 129: 395-400.
- Winkel, M., Pjevac, P., Kleiner, M., Littmann, S., Meyerdierks, A., Amann, R., Mußmann, M. 'Identification and activity of acetate-assimilating bacteria in diffuse fluids venting from two deep-sea hydrothermal systems', *FEMS Microbiology Ecology*, 90:3
- Wolin, E. A., Wolin, M. J., Wolfe, R. S. 1963. 'Formation of methane by bacterial extracts', *J Biol Chem*, 238: 2882-6.
- Wu, Y.-W., Simmons, B. A., Singer, S. W. 2016. 'MaxBin 2.0: an automated binning algorithm to recover genomes from multiple metagenomic datasets', *Bioinformatics*, 32: 605-07.
- Yakimov, M. M., La Cono, V., Denaro, R., D'Auria, G., Decembrini, F., Timmis, K. N., Golyshin, P. N., Giuliano, L. 2007. 'Primary producing prokaryotic communities of brine, interface and seawater above the halocline of deep anoxic lake L'Atalante, Eastern Mediterranean Sea', *The ISME Journal*, 1: 743-55.
- Yilmaz, P., Parfrey, L. W., Yarza, P., Gerken, J., Pruesse, E., Quast, C., Schweer, T., Peplies, J., Ludwig, W., Glöckner, F. O. 2013. 'The SILVA and "All-species Living Tree Project (LTP)" taxonomic frameworks', *Nucleic acids research*, 42: D643-D48.

- Zavarzin, G. A., Zhilina, T. N., Pusheva, M. A. 1994. 'Halophilic Acetogenic Bacteria.' in Harold L. Drake (ed.), *Acetogenesis* (Springer US: Boston, MA).
- Zeikus, J. G., Hegge, P. W., Thompson, T. E., Phelps, T. J., Langworthy, T. A. 1983. 'Isolation and description of Haloanaerobium praevalens gen. nov. and sp. nov, an obligately anaerobic halophile common to Great Salt Lake sediments', *Current Microbiology*, 9: 225-34.
- Zhang, Y., Krause, M., Mutti, M. 2013. 'The Formation and Structure Evolution of Zechstein (Upper Permian) Salt in Northeast German Basin: A Review', *Open Journal of Geology*, 03: 411-26.
- Zhang, Y., Sun, X., Qian, C., Li, L., Shang, X., Xiao, X., Gao, Y. 2022. 'Impact of Petroleum Contamination on the Structure of Saline Soil Bacterial Communities', *Current Microbiology*, 79: 351.
- Zhilina, T. N., Zavarzin, G. A. 1990. 'Extremely halophilic, methylotrophic, anaerobic bacteria', *Fems Microbiology Reviews*, 7: 315-21.
- Zhilina, T. N., Zavarzin, G. A., Rainey, F. A.; Pikuta, E. N., Osipov, G. A.; Kostrikina, N. A. 1997. 'Desulfonatronovibrio hydrogenovorans gen. nov., sp. nov., an Alkaliphilic, Sulfate-Reducing Bacterium', *International Journal of Systematic Bacteriology*, 47: 144-49.
- Zhou, E., Li, F., Zhang, D., Xu, D., Li, Z., Jia, R., Jin, Y., Song, H., Li, H., Wang, Q., Wang, J., Li, X., Gu, T., Homborg, A. M., Mol, J. M. C., Smith, J. A., Wang, F., Lovley, D. R. 2022. 'Direct microbial electron uptake as a mechanism for stainless steel corrosion in aerobic environments', *Water Research*, 219: 118553.
- Zhuang, G.-C., Elling, F. J., Nigro, L. M., Samarkin, V., Joye, S. B., Teske, A., Hinrichs, K.-U. 2016. 'Multiple evidence for methylotrophic methanogenesis as the dominant methanogenic pathway in hypersaline sediments from the Orca Basin, Gulf of Mexico', *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 187: 1-20.
- Ziganshin, A. M., Schmidt, T., Scholwin, F., Il'inskaya, O. N., Harms, H., Kleinsteuber, S. 2011. 'Bacteria and archaea involved in anaerobic digestion of distillers grains with solubles', *Applied Microbiology and Biotechnology*, 89: 2039-52.

7 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Matthias Noll, dafür dass er mir die Möglichkeit gegeben hat, meine Dissertation unter seiner Betreuung zu erstellen und für die besonders hilfreichen Diskussionen. Des Weiteren danke ich Prof. Dr. Tillmann Lüders für die Übernahme des Mentorats und die Anfertigung des zweiten Gutachtens.

Ich danke meinem Betreuer am Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung in Leipzig, Dr. Carsten Vogt, für die Überlassung des Themas und die Bereitstellung der analytischen Infrastruktur im Department für Isotopenbiogeochemie des UFZ Leipzig.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Denny Popp für die Unterstützung und Einführung in die Amplikon- und Metagenomsequenzanalyse, Dr. Hryhoriy Stryhanyuk für das intensive nanoSIMS-Training zu Probenvorbereitung, Messung und Datenauswertung und Dr. Steffen Kümmel für die Einführung in die Isotopenanalytik und die zahlreichen Diskussionen.

Danke auch an Dr. Matthias Schmidt und Dr. Florin Musat für Einführung in Elektronenmikroskopie und anaerobe Kultivierungstechniken, sowie an Dr. Niculina Musat für die informativen Diskussionen und die Möglichkeit die Infrastruktur von ProVIS zu nutzen.

Guido Nowack und Martin Wagner von MicroPro GmbH, vielen Dank für die Bereitstellung der Anreicherungskulturen, die vielen wertvollen Informationen und Diskussionen sowie die gemeinsame Organisation der Probenahmekampagne.

Ich danke Dr. Petra Bombach für ihre Unterstützung beim Start dieses Projektes und die Einführung in das Projekt. Damit danke ich auch der BMBF Zwanzig20 Initiative für die Finanzierung des Projekts.

Ich danke den Studentinnen Andrea Köthe, Lilian Prinsen und Divyasri Nelluri für ihre verlässliche und engagierte Unterstützung während ihrer entsprechenden Abschluss- und Projektarbeiten.

Des Weiteren danke ich Florian Tschernikl, Katja Nerlich, Jasmin Voigt, Stephan Krantz, Nicole Steinbach und Ute Lohse für ihre Unterstützung im Labor.

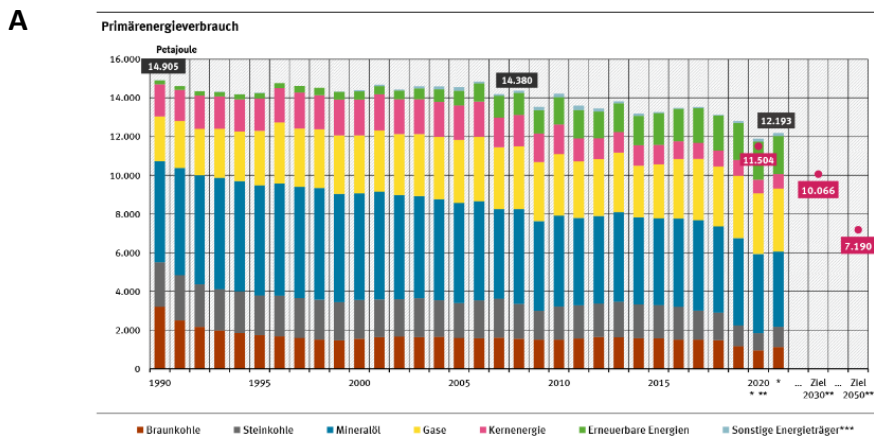
Ich danke unseren Partnern aus Industrie und Forschung für die Möglichkeit der Probenahme am Kavernenfeld sowie für die vielen interessanten Einblicke während der Zusammenarbeit.

Vielen Dank auch an die *Halophiles* Gemeinschaft für die Möglichkeit meine Ergebnisse bei der HALOPHILES2022 Konferenz vorzustellen und die vielen fruchtbaren Diskussionen die sich daraus ergaben.

Abschließend danke ich meinen Arbeitskollegen für die vergangenen 4 Jahre, die reich an neuen Freundschaften und gemeinsamen Erlebnissen waren.

8 Anhang

8.1 Diagramme und Daten zum Energieverbrauch



B

Primärenergieimporte

Energieträger	Importquote 2020*	Anteil des Energieträgers am Primärenergieverbrauch 2020	Anteil des Energieträgers an der Bruttostromerzeugung 2020
Braunkohle	-2,2 %	8,0 %	16,0 %
Steinkohle	100,0 %	7,5 %	11,3 %
Uran	100,0 %	5,9 %	11,3 %
Mineralöl	98,0 %	34,3 %	16,1 %
Erdgas**	94,4 %	26,5 %	0,8 %
Erneuerbare Energien***	0,8 %	16,5 %	43,9 %

Quelle: Umweltbundesamt, Aufholgruppe Erneuerbare Energien Statistik (AGEE-Stat) und auf Basis von: AG Energieeffizienz, Anwertragsstellen des Energieeffizienz-Deutschland 1990 bis 2020, Stand 09/2021; AG Energieeffizienz, Bruttostromerzeugung in Deutschland von 1990 bis 2020 nach Energieträgern, Stand 02/2021

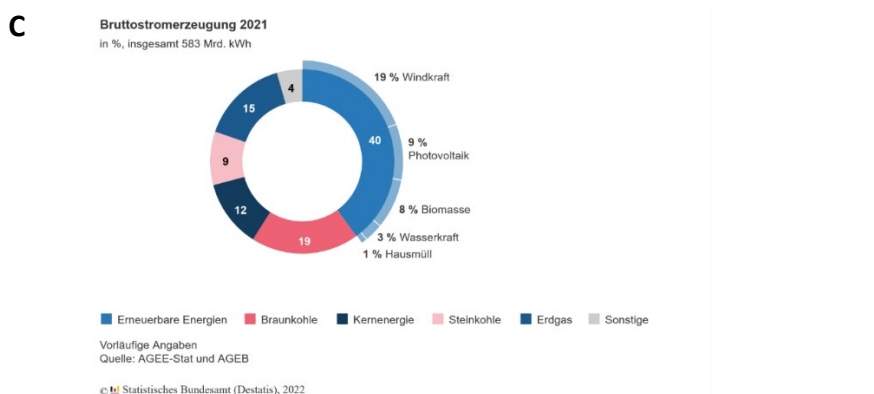


Abbildung 21 Energiedaten zu Deutschland

- A:** Quelle: <https://www.umweltbundesamt.de/daten/energie/>, Seite aufgerufen: 12/22
- B:** Quelle: <https://www.umweltbundesamt.de/daten/energie/primaerenergiegewinnung-importe>, Seite aufgerufen: 12/22
- C:** Quelle: https://www.destatis.de/DE/Themen/Branchen-Unternehmen/Energie/_inhalt.html, Seite aufgerufen: 12/22

8.2 Methodenentwicklung für die Messungen am nanoSIMS

Um eine sensitive und reproduzierbare Methode zu entwickeln, wurde die quantitative Extraktion der H-haltigen H^- , CH^- , C_2H^- Ionen mittels nanoSims auf verschiedenen Proben etabliert. Als Referenzmaterial wurden in $^2\text{H}_2\text{O}$ inkubierte Pflanzenwurzeln eingesetzt. Ziel war die differenzierte Messung aller Ionenspezies (Tabelle 29) in einer Messung. Da die Massen einzelner Ionen sehr ähnlich sind, wurde bei jeder zweiten Messung die Ablenkspannung variiert (peak-switching) um zusätzlich $^{12}\text{C}^{13}\text{C}$ (mit $^{12}\text{C}_2^1\text{H}^-$) und $^{13}\text{C}^{14}\text{N}$ (mit $^{12}\text{C}^{15}\text{N}^-$) sowie $^{12}\text{C}_2^2\text{H}^-$ (mit $^{12}\text{C}^{14}\text{N}^-$) aufnehmen zu können (Massen 25, 26 und 27).

Tabelle 29 Akquirierte Ionen

Gruppe	Ion	Masse	Interferierendes Ion (Masse des interferierenden Ions)	
1	$^{12}\text{C}_2^1\text{H}$	25,007825	$^{12}\text{C}^{13}\text{C}$ (25,003354)	
2	$^{12}\text{C}_2^2\text{H}$	26,014101	$^{12}\text{C}^{14}\text{N}$ (26,003074)	$^{13}\text{C}_2$ (26,006709)
			$^{12}\text{C}^{13}\text{C}^1\text{H}$ (26,011179)	$^{12}\text{C}_2^1\text{H}_2$ (26,015650)
3	$^{13}\text{C}^{14}\text{N}$	27.006428		

Bei der Messung der Wurzelproben zeigte sich, dass die Messwerte, welche über das $^2\text{H}^-$, C^2H^- und das O^2H^- Signal aufgenommen wurden, eine hohe Varianz und geringe Zählrate zeigten (Abbildung 24 AB). Werte mit einer geringeren Streuung wurden in einer höheren Zählrate für C_2^2H^- -Ionen gemessen (Abbildung 24 C). Jedoch wurde in diesem Fall der Mittelwert der natürlichen Häufigkeit von ^2H von 0,015 nach 0,03 verschoben, da neben den C_2^2H^- Ionen auch C_2^1H_2^- Ionen einen Beitrag zum Gesamtwert leisteten (Abbildung 24 CF). Dieser Betrag der C_2^1H_2^- -Ionen ist bei der Messung von Proben, die künstlich in ^2H angereichert sind, jedoch so gering, dass er innerhalb des Standardfehlers war und vernachlässigt werden konnte (Abbildung 25).

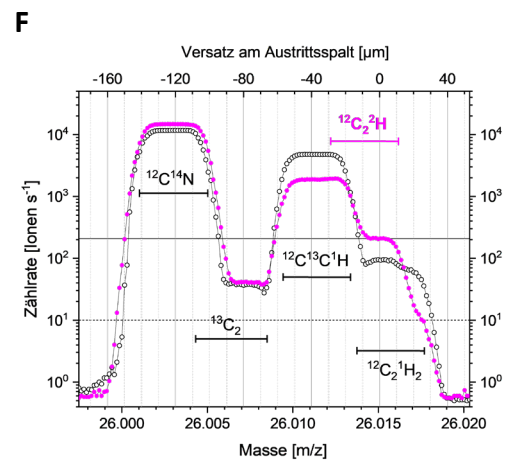
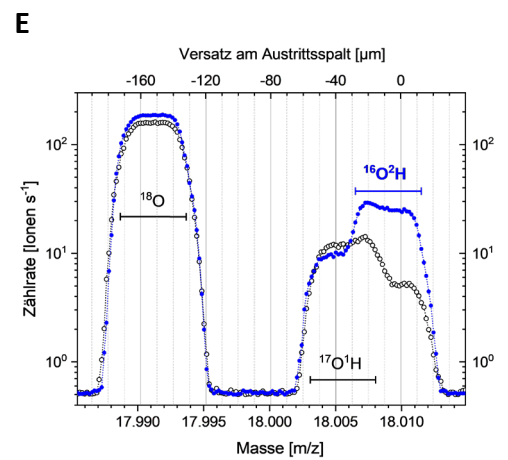
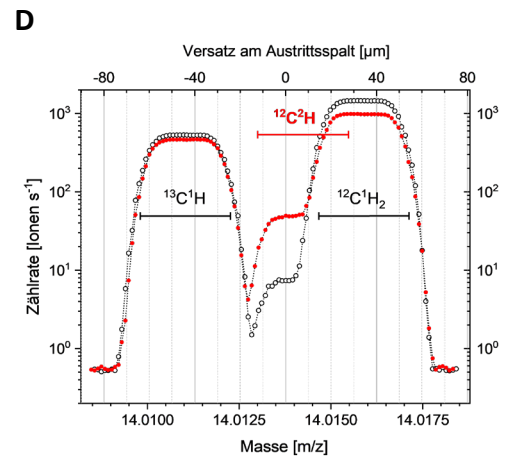
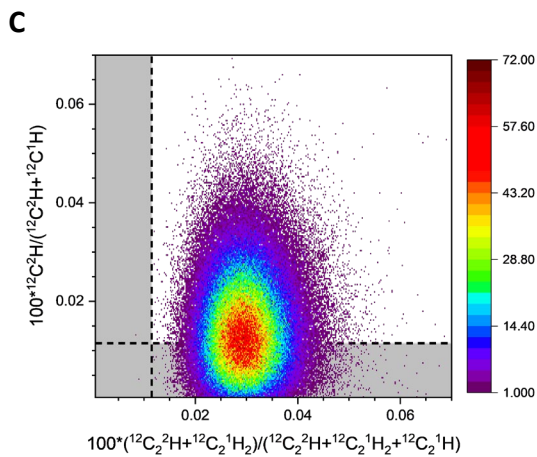
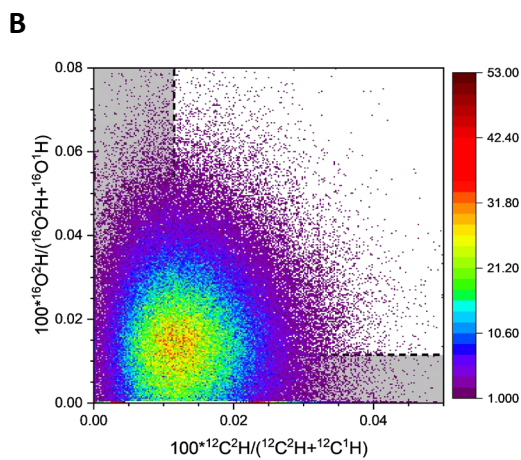
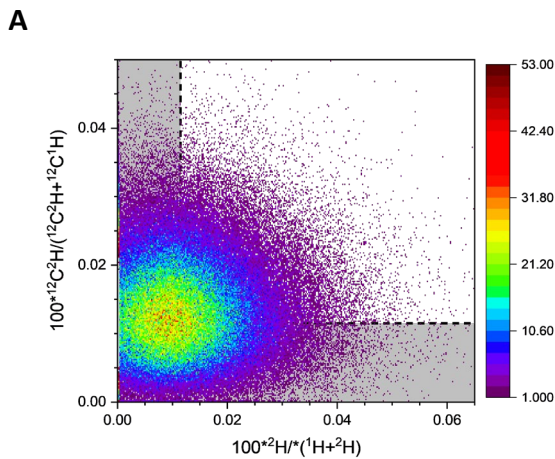


Abbildung 22 Verteilung der ^2H Fraktion pro Pixel auf einer Testprobe

Als Testprobe diente eine eingebettete Pflanzenwurzel, die zuvor in $^1\text{H}_2\text{O}$ inkubiert wurde. Die natürliche Häufigkeit von ^2H wurde über die Häufigkeit folgender Ionen pro Pixel desselben Sichtfeldes berechnet: **(A)** $\text{C}^1\text{H}/\text{C}^2\text{H}$, **(B)** $\text{O}^1\text{H}/\text{O}^2\text{H}$, **(AC)** $\text{C}^1\text{H}/\text{C}^2\text{H}$ und **(C)** $\text{C}_2^1\text{H}/\text{C}_2^2\text{H}$. Rechts ist die Zählrate der Ionen in Abhängigkeit einer Veränderung der Ablenkspannung aufgetragen.

Das Verhältnis von leichtem zu schwerem Isotop ($R = {}^{12}\text{C}_2^2\text{H}/{}^{12}\text{C}_2^1\text{H}$) dient als Grundlage zur Berechnung ihrer Fraktion ($D = \frac{R}{R+1}$). Bei der Berechnung der natürlichen Häufigkeit des ^2H

Isotops ($D_0^{2\text{H}} = 0.000115 \equiv D_0$) aus den $^{12}\text{C}_2^{2\text{H}-}$ und $^{12}\text{C}_2^{1\text{H}}$ -Ionen kommt es durch Überlagerung der $^{12}\text{C}_2^{2\text{H}}$ und $^{12}\text{C}_2^{1\text{H}_2}$ Peaks (Abbildung 12, unten rechts) zu einer Überschätzung des Wertes. Die aus dem Isotopenverhältnis abgeleitete ^2H -Fraktion ($D'_0 = 0.000296 \pm 0.000053$) ist verfälscht und muss korrekterweise wie folgt ausgedrückt werden:

$$D' = \frac{^{12}\text{C}_2^{2\text{H}} + ^{12}\text{C}_2^{1\text{H}_2}}{(^{12}\text{C}_2^{2\text{H}} + ^{12}\text{C}_2^{1\text{H}_2}) + ^{12}\text{C}_2^{1\text{H}}}$$

Eine Umstellung nach $^{12}\text{C}_2^{1\text{H}_2}$ erlaubt dann die Definition von D_0^{Add} , der Fraktion von $^{12}\text{C}_2^{1\text{H}_2}$, die dann vom Gesamtwert abgezogen werden kann und somit den realen Wert liefert.

$$D_0^{\text{Add}} = \frac{D'_0 - D_0}{D'_0(1 - D_0)}$$

Bei einer steigenden Fraktion (D) des ^2H isotopes, wird erwartet, dass der Beitrag D^{Add} der $^{12}\text{C}_2^{1\text{H}_2}$ Ionen im unaufgelösten $^{12}\text{C}_2^{2\text{H}}$ und $^{12}\text{C}_2^{1\text{H}_2}$ Massenpeak sinkt und die aus den

$$D^{\text{Add}} = \frac{D' - D}{D'(1 - D)}$$

Ionenzahlen in dem unaufgelösten $^{12}\text{C}_2^{2\text{H}}$ und $^{12}\text{C}_2^{1\text{H}_2}$ und $^{12}\text{C}_2^{1\text{H}}$ Massenpeaks abgeleitete ^2H -Fraktion D' sich wegen der dabei sinkenden Zahl der $^{12}\text{C}_2^{1\text{H}_2}$ an den tatsächlichen D Wert der ^2H -Fraktion nähert. Das oben beschriebene Verhalten von D^{Add} und D' ist in Abbildung 13 dargestellt.

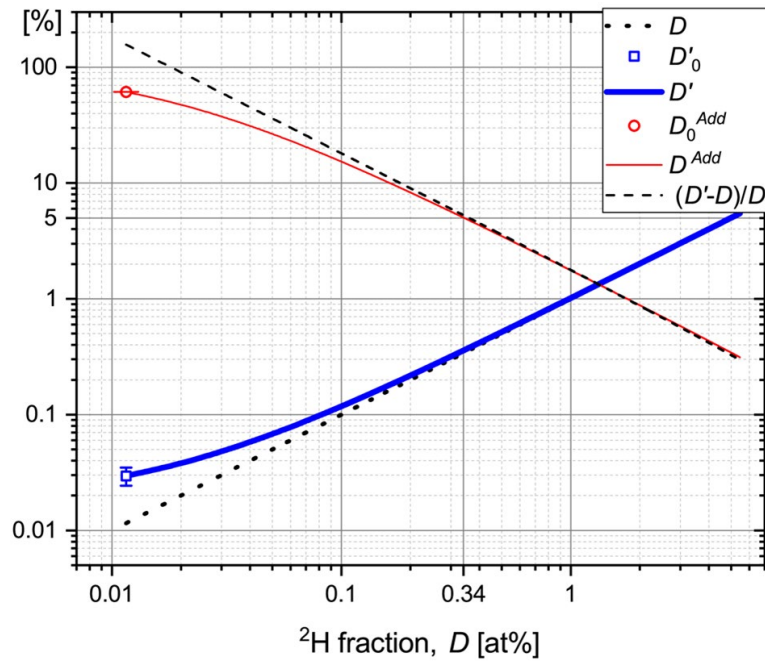


Abbildung 23 Simulierte Auswirkung des Beitrages von $C_2^1H_2$ auf den Anteil von C_2^2H D^{Add} (Beitrag von $C_2^1H_2$) beginnend mit einem Anteil von 61.156 At. % (rot) und der um diesen Beitrag korrigierte Wert (D' , blau) bei steigendem 2H Anteil.

Mit der in dieser Arbeit vorgeschlagenen Annäherung zur Berechnung von D^{Add} , kann die 2H -Fraktion D_r aus der mit nanoSIMS gemessenen D' rekonstruiert werden.

$$D^{Add} = \frac{R_0^{Add} \times R_0}{R_0^{Add} \times R_0 + R}$$

R_0 und R bezeichnen das $2H/1H$ Isotopenverhältnis bei der natürlichen Häufigkeit (R_0) und bei der Anreicherung (R) bezeichnen; $R_0^{Add} = \frac{^{12}C_2^1H_2}{^{12}C_2^2H}$ stellt das Verhältnis der $^{12}C_2^1H_2^-$ Ionen zu den $^{12}C_2^2H^-$ Ionen in dem unaufgelösten $^{12}C_2^2H$ und $^{12}C_2^1H_2$ Massenpeak dar. Die rekonstruierte 2H -Fraktion wird wie folgt berechnet.

$$D_r = \frac{R' - R_0^{Add} \times R_0}{R' - R_0^{Add} \times R_0 + 1}$$

Es zeigte sich jedoch, dass die Anreicherung so stark war, dass der Beitrag der $^{12}C_2^1H_2^-$ Ionen nur eine untergeordnete Rolle spielte.

8.3 Metagenomdaten

Tabelle 24 Gene des Wood-Ljungdahl-Weges in den metagenom- assemblierten Genomen (MAGs) der Anreicherungskultur MP-32

Gen [EC Nummer]	Metagenom-assembliertes Genom (MAG)							
	1	2	3	4	5	6	7	8
acetyl-CoA decarboxylase/synthase complex [EC:2.3.1.-] [RN:R10243]	0	0	1	0	0	1	0	0
acetyl-CoA decarboxylase/synthase complex [EC:2.3.1.-] [RN:R10243]	0	0	1	0	0	1	0	0
carbon-monoxide dehydrogenase [EC:1.2.7.4] [RN:R07157]	0	0	3	0	1	2	0	0
methylenetetrahydrofolate reductase (NADPH) [EC:1.5.1.20] [RN:R07168]	1	0	2	0	1	3	1	0
methylenetetrahydrofolate dehydrogenase (NADP+) / methenyltetrahydrofolate cyclohydrolase [EC:1.5.1.5 3.5.4.9] [RN:R01655 R01220]	0	1	1	1	1	1	0	1
formate--tetrahydrofolate ligase [EC:6.3.4.3] [RN:R00943]	1	2	1	1	0	1	0	2
formate dehydrogenase [EC:1.17.1.10] [RN:R00134]	0	0	0	0	0	0	0	0
acetyl-CoA synthase [EC:2.3.1.169] [RN:R08433]	0	0	1	0	0	1	0	0
formate dehydrogenase [EC:1.17.1.10] [RN:R00134]	0	0	1	0	0	2	0	0
5-methyltetrahydrofolate corrinoid/iron sulfur protein methyltransferase [EC:2.1.1.258] [RN:R02289]	0	1	2	0	0	2	0	0

Tabelle 25 Gene des Wood-Ljungdahl-Weges in den metagenom-assemblierten Genomen (MAGs) der Anreicherungskultur SF-X

Gen [EC Nummer]	Metagenom-assembliertes Genom (MAG)								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
acetyl-CoA decarboxylase/synthase complex [EC:2.3.1.-] [RN:R10243]	0	1	0	0	1	0	0	0	0
acetyl-CoA decarboxylase/synthase complex [EC:2.3.1.-] [RN:R10243]	0	1	0	0	1	0	0	0	0
carbon-monoxide dehydrogenase [EC:1.2.7.4] [RN:R07157]	0	2	0	0	0	0	0	0	0
methylenetetrahydrofolate reductase (NADPH) [EC:1.5.1.20] [RN:R07168]	0	0	0	0	0	1	1	1	1
methylenetetrahydrofolate dehydrogenase (NADP+) / methenyltetrahydrofolate cyclohydrolase [EC:1.5.1.5 3.5.4.9] [RN:R01655 R01220]	1	1	1	1	1	0	1	0	0
formate--tetrahydrofolate ligase [EC:6.3.4.3] [RN:R00943]	2	1	1	1	0	1	0	0	1
formate dehydrogenase [EC:1.17.1.10] [RN:R00134]	0	0	0	0	0	0	0	0	0
acetyl-CoA synthase [EC:2.3.1.169] [RN:R08433]	0	1	0	0	0	0	0	0	0
formate dehydrogenase [EC:1.17.1.10] [RN:R00134]	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5-methyltetrahydrofolate corrinoid/iron sulfur protein methyltransferase [EC:2.1.1.258] [RN:R02289]	0	4	0	1	0	0	0	0	0

Tabelle 26 Laktat-Dehydrogenase der MAGs in den metagenom-assemblierten Genomen (MAGs) der Anreicherungskultur SF-X

Gen [EC Nummer]	Metagenom-assembliertes Genom (MAG)								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
L-lactate dehydrogenase [1.1.1.27]	1	1	0	0	0	1	0	0	0
D-lactate dehydrogenase [1.1.1.28]	0	0	0	1	0	0	0	0	0

9 Publikationen, Präsentationen und Poster

Weitere Publikationen aus dieser Arbeit:

Schwab, L., Yamborko, N., Polerecky, L., Davoudpour, Y., Berthelot, H., Musat, N., Milferstedt, K., Hamelin, J., Richnow, H. H., Vogt, C., Stryhanyuk, H. (in Vorbereitung). Deuterium marker in multi-isotope tracing of cellular metabolic activity with SIP-nanoSIMS

Schwab, L., Nowack, G., Popp, D., Jehmlich, N., Noll, M., Stryhanyuk, H, Vogt, C. (in Vorbereitung). Identification of microbial activity in brine from natural gas storage sites.

Konferenzpräsentationen und Poster:

Schwab, L., Nowack, G., Stryhanyuk, H., Vogt, C., Wagner, M., Richnow, H.-H. (2022). Analysis of brines and microbiomes used for underground gas storage. 13th Conference on Halophilic Microorganisms: HALOPHILES2022, Alicante, Spanien, 26. – 29.06.2022. Vortrag.

Schwab, L., Vogt, C., Richnow, H.-H., Stryhanyuk, H., (2022). A nanoSIMS-SIP approach to study activity of extremely halophilic microorganisms from a subsurface salt formation. Joint Astrobiological Science Conference of the AGU and NASA: AbSciCon22, Atlanta, Georgia & online, 15. – 20.05.2022. Poster mit Vortrag / 409-01.

Schwab, L., Bombach, P. Nowack, G., Richnow, H.-H., Vogt, C., (2020). Halophilic life in gas storage caverns?. 6. Gemeinsame Tagung der DGHM und VAAM, Leipzig, Deutschland, 8. – 11.03.2020. Poster / 515-EMP.

Weitere Veröffentlichungen, die während dieser Arbeit entstanden:

Dai, S., Korth, B., Schwab, L., Aulenta, F., Vogt, C., Harnisch, F., (2022). Deciphering the fate of sulfate in one- and two-chamber bioelectrochemical systems. *Electrochim. Acta* 408 , art. 139942

Metze, D., Popp, D., Schwab, L., Keller, N.-S., Nunes da Rocha, U., Richnow, H.-H., Vogt, C., (2021). Temperature management potentially affects carbon mineralization capacity and microbial community composition of a shallow aquifer. *FEMS Microbiol. Ecol.* 97 (2), fiae261

10 (Eidesstattliche) Versicherungen und Erklärungen

(§ 9 Satz 2 Nr. 3 PromO BayNAT)

Hiermit versichere ich eidesstattlich, dass ich die Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe (vgl. Art. 97 Abs. 1 Satz 8 BayHIG).

(§ 9 Satz 2 Nr. 3 PromO BayNAT)

Hiermit erkläre ich, dass ich die Dissertation nicht bereits zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht habe und dass ich nicht bereits diese oder eine gleichartige Doktorprüfung endgültig nicht bestanden habe.

(§ 9 Satz 2 Nr. 4 PromO BayNAT)

Hiermit erkläre ich, dass ich Hilfe von gewerblichen Promotionsberatern bzw. -vermittlern oder ähnlichen Dienstleistern weder bisher in Anspruch genommen habe noch künftig in Anspruch nehmen werde.

(§ 9 Satz 2 Nr. 7 PromO BayNAT)

Hiermit erkläre ich mein Einverständnis, dass die elektronische Fassung meiner Dissertation unter Wahrung meiner Urheberrechte und des Datenschutzes einer gesonderten Überprüfung unterzogen werden kann.

(§ 9 Satz 2 Nr. 8 PromO BayNAT)

Hiermit erkläre ich mein Einverständnis, dass bei Verdacht wissenschaftlichen Fehlverhaltens Ermittlungen durch universitätsinterne Organe der wissenschaftlichen Selbstkontrolle stattfinden können.

.....

Ort, Datum, Unterschrift

