

Diss. ETH No. 15337

Interrelations of methanogens and sulfate-reducing bacteria in sediments of through-flow and stratified lakes

A dissertation submitted to the
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZURICH
for the degree of
Doctor of Natural Sciences

presented by
EMEL SAHAN
MSc. Middle East Technical University, Ankara
born 30.03.1970
citizen of Turkey

accepted on the recommendation of
Prof. Dr. Bernhard Wehrli, examiner
Prof. Dr. Alexander J.B. Zehnder, co-examiner
Dr. Kornelia Zepp, co-examiner

2004

Summary

Methanogenesis and sulfate reduction play major roles as the final reduction steps in the mineralization of organic matter in lake sediments. The factors affecting competition, coexistence and synergies between the two groups of sulfate-reducing bacteria and methanogenic *Archaea* are still controversially discussed in microbial ecology. The availability of sulfate, the quantity and bioavailability of the organic matter and temperature have been established as governing external factors. So far only little is known about the influence of the sedimentation regime and the seasonal changes in the concentration of sulfate and bioavailable organic substrates on the communities of methanogenic *Archaea* and sulfate-reducing bacteria in the sediments of freshwater lakes.

This thesis reports the results from three complementary studies to elucidate the governing factors for the distribution of sulfate-reducing bacteria and methanogenic *Archaea* in different sedimentary environments. For this purpose, the sediments at the inlets and outlets of the three shallow through-flow lakes, Uzlina, Matita and Rosu in the Danube Delta in Romania and at the deepest sites of two stratified mesotrophic lakes in Switzerland, Lake Cadagno and Rotsee were analyzed. Oxygen was always available in the bottom water of Danube Delta lakes, however, Rotsee was seasonally anoxic and the hypolimnion of meromictic Lake Cadagno was permanently anoxic. The in-situ hybridization (CARD-FISH) technique was used to quantify *Bacteria*, the families of sulfate-reducing bacteria (*Desulfovibrionaceae*, *Desulfobacteriaceae*) and methanogenic *Archaea*. The relevant chemical parameters in the pore-water such as pH, alkalinity, CH₄, SO₄²⁻, S(-II) and NH₄⁺ were determined by dialysis sampling techniques and the bioavailable organic matter input was estimated from the total hydrolyzable amino acid concentrations.

In all three studies sulfate-reducing bacteria and methanogenic *Archaea* were observed in with maximum densities in the surface layers and with decreasing numbers at greater depths. The presence of high numbers of methanogens in the zone of sulfate reduction was interpreted as evidence for anoxic microniches, the 3-D heterogeneity. The significant cell counts of sulfate-reducing bacteria in the absence of sulfate gradients in deeper layers were an indication for the versatility of metabolic pathways of this group. A synergistic relation between methanogenic *Archaea* and sulfate-reducing bacteria in the absence of sulfate diffusion requires an active role of SRB in the fermentation process.

The comparative study at the inflow and outflow of three through-flow lakes in Danube Delta indicated that the hydrological distance and sedimentation regime had a strong influence on microbial communities. Cell counts were typically higher near the outflow, where the supply of allochthonous material was more intense and input of mineral particles that reduced the bioavailability of organic matter was less important.

The concentration of total hydrolyzable amino acids (THAA) proved to be a reliable predictor for the abundance of anaerobic microorganisms in the different sedimentary environments studied in this thesis. Although oxygen availability in the bottom water was different in each lake, the ratio of amino acids to total organic carbon, THAA-C/TOC, was quite uniform among the different lakes, but decreased with sediment depth. Measurements of individual amino acids, however, might provide valuable additional information. Analysis in Lake Cadagno and Rotsee provided evidence for preferential adsorption of specific amino acids like glutamic acid to calcite particles, which complicates the interpretation of amino acid profiles.

Zusammenfassung

Methanogenese und Sulfat-Reduktion spielen als abschliessende Reduktionsschritte wesentliche Rollen bei der Mineralisierung von organischem Material in See-Sedimenten. Die beeinflussenden Faktoren für den Wettbewerb, die Koexistenz und die Synergien zwischen den zwei Gruppen der sulfat-reduzierenden Bakterien und der methanogenen *Archaea* werden in der mikrobiologischen Ökologie noch immer kontrovers diskutiert. Verfügbarkeit von Sulfat, Menge und biologische Verfügbarkeit des organischen Materials und Temperatur wurden als bestimmende externe Faktoren festgelegt. Über den Einfluss des Sedimentations-Regimes, der saisonalen Veränderungen der Sulfatkonzentrationen und die biologische Verfügbarkeit des organischen Substrates auf die Gemeinschaft methanogenen *Archaea* und sulfat-reduzierenden Bakterien in den Sedimenten von Süswasserseen ist bisher noch wenig bekannt.

In dieser Studie werden die Ergebnisse von drei sich ergänzenden Untersuchungen zur Bestimmung der ausschlaggebenden Faktoren für die Verteilung von sulfat-reduzierenden Bakterien und methanogenen *Archaea* in verschiedenen Umgebungen des Sediments dargestellt. Zu diesem Zweck wurden die Sedimente sowohl der Zuflüsse als auch der Abflüsse der drei seichten Durchfluss-Seen Uzlina, Matita and Rosu im Donau-Delta in Rumänien analysiert. Ebenso wurden die tiefsten Stellen der zwei geschichteten mesotrophischen Seen Lago Cadagno und Rotsee in der Schweiz untersucht. In den Seen des Donau-Deltas war im bodennahen Wasser immer Sauerstoff vorhanden. Der Rotsee hingegen war saisonal bedingt anoxisch und das Hypolimnion des meromiktischen Lago Cadagno permanent anoxisch. Die *In-situ* Hybridisierungstechnik (CARD-FISH) wurde verwendet, um die Familien der sulfat-reduzierenden Bakterien (*Desulfovibrionaceae*, *Desulfobacteriaceae*) und der methanogenen *Archaea* zu quantifizieren. Die in dem Porenwasser relevanten chemischen Parameter wie pH, Alkalinität, CH₄, SO₄²⁻, S(-II) und NH₄⁺ wurden durch Dialyse-Sampling-Methoden bestimmt. Die biologische Verfügbarkeit des organischen Materials wurde über die Gesamt-Hydrolyse der Aminosäure-Konzentrationen geschätzt.

In allen drei Studien konnte beobachtet werden, dass die sulfat-reduzierenden Bakterien und die methanogenen *Archaea* mit maximaler Dichte in den Oberflächenschichten vorkommen und mit zunehmender Tiefe die Anzahl abnimmt. Die Gegenwart von grossen Mengen an Methanproduzenten in der Zone der Sulfat-Reduktion wurde als Beweis für eine anoxische

Mikronische der 3-D Heterogenität interpretiert. Die signifikanten Zellzahlen der sulfat-reduzierenden Bakterien bei Abwesenheit von Sulfat Gradienten in den tieferen Schichten waren ein Hinweis auf die Vielseitigkeit der metabolischen Pfade dieser Gruppe. Eine synergistische Beziehung zwischen den methanogenen *Archaea* und den sulfat-reduzierenden Bacteria bei Abwesenheit von Sulfatdiffusion erfordert eine aktive Rolle von SRB im Fermentations-Prozess.

Die vergleichende Untersuchung der Zu- und Abflüsse der drei Durchfluss-Seen im Donau-Delta indizierte, dass die hydrologische Distanz und das Sedimentations-Regime einen starken Einfluss auf die mikrobiologischen Gemeinschaften haben. Wie zu erwarten, waren die Zellzahlen in der Nähe des Abflusses wegen der intensiveren Versorgung mit allochthonem Material höher. Die Zufuhr von mineralischen Partikeln, welche die biologische Verfügbarkeit des organischen Materials reduzierten, war weniger wichtig.

Die Konzentration von totalen hydrolysierenden Aminosäuren (THAA) erwies sich als ein zuverlässiger Parameter zur Vorhersage für die Abundanz von anaeroben Mikroorganismen in den unterschiedlichen Umgebungen der Sedimente, welche in dieser Studie untersucht wurden. Obwohl die Verfügbarkeit des Sauerstoffes im bodennahen Wasser unterschiedlich war, so ist doch das Verhältnis der Aminosäuren zum totalen organischen Kohlenstoff, THAA – C/TOC, der verschiedenen Seen einheitlich. Mit zunehmender Sediment-Tiefe nahm das Verhältnis jedoch ab. Messungen von individuellen Aminosäuren, könnten wertvolle zusätzliche Informationen liefern. Die Analysen im Lago Cadagno und im Rotsee lieferten Beweise für bevorzugte Adsorptionen von spezifischen Aminosäuren, wie Glutaminsäure, an Calcit-Partikeln, was die Interpretation von Aminosäureprofilen verkompliziert.