

DISS. ETH NO. 25963

Microbial cycling of formate and other low-molecular weight aliphatic organic acids in anoxic environments

A thesis submitted to attain the degree of
DOCTOR OF SCIENCES of ETH ZURICH
(Dr. sc. ETH Zurich)

presented by
Philip Eickenbusch
M.Sc. Water Science, University Duisburg-Essen, Germany

born on 02.08.1986
citizen of
Germany

accepted on the recommendation of
Prof. Dr. Mark Alexander Lever
Prof. Dr. Bo Barker Jørgensen
Dr. Clemens Glombitza
Prof. Dr. Bernhard Schink

2019

Summary

Short-chain organic acids (SCOAs) are important intermediates in the microbial and thermogenic degradation of photosynthesis-derived organic matter, and in the abiotic synthesis of organic compounds. Despite the vast environmental importance of SCOAs, many questions remain open concerning the controls on their environmental turnover. This is true for acetate, propionate, and butyrate, which have been the subject of many past investigations, as well as for formate, which is the focus of this dissertation. To better elucidate the controls on environmental formate turnover, I therefore combined detailed analyses on natural geochemical gradients, experimental incubations, thermodynamic calculations, and a newly developed assay targeting a marker gene of formate cycling, the alpha subunit of formate hydrogenase (*fdhA*).

In my first research chapter, I investigated formate turnover in Swiss lake sediment based on analyses of natural samples and batch incubations with added ^{13}C -formate (Chapter 2). The batch experiments indicate rapid conversion of formate to H_2 and HCO_3^- , and that this process is catalyzed by microbial cells rather than free enzymes. This interpretation is supported by calculations indicating that formate conversion to H_2 and HCO_3^- is an exergonic process with free energies around the minimum that can be conserved by microorganisms. Additional incubations of marine sediments, activated sludge, anaerobic digester sludge, and river water indicate that similar mechanisms control formate cycling in other anaerobic environments, but that formate turnover operates differently in the presence of O_2 . Furthermore, *fdhA* analyses indicate the genetic potential for formate cycling to be common, with *fdhA* gene copy numbers in the same range as total 16S rRNA genes, and widespread among phylogenetically diverse, mostly unknown lacustrine sediment microorganisms.

To follow up on the results from marine sediments, I next compared formate turnover to the turnover of acetate, propionate, butyrate in sulfate reducing and methanogenic sediment from Aarhus Bay (Chapter 3). My results indicate that formate is turned over by a similar mechanism as in lake sediment, i.e. via the conversion to H_2 and HCO_3^- , and that the turnover rate of formate is not only vastly higher than for the other SCOAs, but also higher in methanogenic than in sulfate reducing sediment. By contrast, no significant increases in H_2 or formate concentrations occurred in acetate, propionate and butyrate treatments, suggesting complete oxidation by single microorganisms and/or presence of highly efficient syntrophic consortia that leak

minimal amounts of interspecies electron carriers to growth media. As in lake sediment, gene copy numbers of *fdhA* are in a range comparable to total 16S rRNA genes, and occur across a phylogenetically diverse number of groups.

In the final research chapter, I investigated a transect of serpentinite mud volcanoes in the Mariana Convergent Margin to shed light into the origin of short-chain organic acids, H₂, and methane and their potential to sustain microbial life in these mud volcanoes. My results indicate that high amounts of H₂, formate, acetate, and methane are produced by and/or are an indirect outcome of serpentinitic weathering of mantle rock in the underlying subducting slab. Hereby concentrations of these compounds correlate with slab temperatures, and formate and acetate concentrations in mud fluids follow an Arrhenius-type, exponential relationship with temperature in the subducting slab. Unlike lacustrine and marine sediments, formate is at thermodynamic equilibrium with H₂ and HCO₃⁻. Thus, the elevated concentrations of formate can be explained with formate equilibration with H₂ produced by serpentinization. By contrast, the drivers behind the elevated acetate and methane concentrations are uncertain. Furthermore, even though calculations indicate a wide range of microbial metabolic reactions to be thermodynamically favorable, I find no evidence of an active microbial biosphere.

Overall, this thesis presents new insights into the role and microbial turnover mechanisms of formate, as well as other SCOAs, H₂, and methane in seafloor and lacustrine environments. Results can be used for further research by increasing the sequencing depth of available *fdhA* genes from various environments and samples. This would be highly beneficial to investigate the change of relative abundance in various sediment types and redox conditions and to identify patterns in abundance to see if diversity is due to the redox state and dominating terminal respiration process, or maybe correlated with other parameters like depth and/or diagenetic status of organic matter. Confirmation of the here presented proposal of abiotic serpentinite driven acetate production mechanisms are of interest for further research on origin of life and for astrobiologists, serpentinization is ubiquitous on other planets and acetate is an important energy substrate for known catabolism.

Zusammenfassung

Kurzkettige organische Säuren (SCOAs) sind wichtige Zwischenprodukte beim mikrobiellen und thermogenen Abbau von aus der Photosynthese stammendem organischem Material und bei der abiotischen Synthese organischer Verbindungen. Trotz der enormen von SCOAs für die Mikrobiologie bleiben viele Fragen hinsichtlich der Kontrolle des Umsatzes offen. Dies gilt für Acetat, Propionat und Butyrat, die Gegenstand zahlreicher Untersuchungen in der Vergangenheit waren, sowie für Formiat, welches den Schwerpunkt dieser Dissertation bildet. Zur besseren Aufklärung der Kontrollen des Umsatzes in der Umwelt sind hier daher detaillierte Analysen natürlicher geochemischer Gradienten, experimenteller Inkubationen, thermodynamischer Berechnungen und eines neu entwickelten Assay, der auf ein Markergen des Formiatumsatzes, die alpha-Subunit von Formathydrogenase (*fdhA*) abzielt, kombiniert.

In meinem ersten Forschungskapitel untersuchte ich den Umsatz von Formiat in Schweizer Seesedimenten anhand von Analysen natürlicher Proben und Batch-Inkubationen mit ^{13}C -Format (Kapitel 2). Die Batch-Experimente zeigen eine schnelle Umwandlung von Formiat zu H_2 und HCO_3^- und dass dieser Prozess von mikrobiellen Zellen anstatt von freien Enzymen katalysiert wird. Diese Interpretation wird durch Berechnungen gestützt, die darauf hindeuten, dass die Umwandlung von Formaten in H_2 und HCO_3^- ein exergonischer Prozess mit freien Energien um das Minimum ist, welche von Mikroorganismen konserviert werden können. Zusätzliche Inkubationen von Meeressedimenten, Belebtschlamm, anaeroben Faulschlamm und Flusswasser deuten darauf hin, dass ähnliche Mechanismen den Umsatz von Formiat in anderen anaeroben Umgebungen steuern, dieser jedoch in Gegenwart von O_2 anders abläuft. Darüber hinaus weisen *fdhA*-Analysen darauf hin, dass das genetische Potenzial für den Formatzyklus weit verbreitet ist, wobei die Anzahl der *fdhA*-Genkopien im selben Bereich wie die Gesamtmenge an *16S rRNA*-Genen liegt und unter phylogenetisch unterschiedlichen, meist unbekanntem Mikroorganismen der lakustrischen Sedimente verbreitet ist.

Um die Ergebnisse aus lakustrischen Sedimenten zu verfolgen, verglich ich als nächstes den Formatumsatz mit dem Umsatz von Acetat, Propionat, Butyrat in sulfatreduzierenden und methanogenen Sedimenten aus der Aarhus-Bucht (Kapitel 3). Meine Ergebnisse zeigen, dass Format durch einen ähnlichen Mechanismus wie in

Seesediment umgedreht wird, das heißt durch die Umwandlung in H_2 und HCO_3^- , und dass die Fluktuationsrate von Formiat nicht nur erheblich höher ist als bei den anderen SCOAs, sondern auch im methanogenen Sediment im Vergleich zu sulfatreduzierendem Sediment. Im Gegensatz dazu trat bei Acetat-, Propionat- und Butyrat-Inkubationen kein signifikanter Anstieg der H_2 - oder Formiat-Konzentrationen auf, was auf eine vollständige Oxidation durch einzelne Mikroorganismen und/oder das Vorhandensein hocheffizienter syntrophischer Konsortien hindeutet, die minimale Mengen an Elektronenträgern zwischen den Spezies an das Medium abgeben. Wie im Seesediment liegen die Genkopienanzahl von *fdhA* in einem Bereich, der mit den gesamten *16S rRNA*-Genen vergleichbar ist und es ist eine phylogenetisch hohe Diversität zu beobachten.

Im abschließenden Forschungskapitel untersuchte ich einen Transekt von Serpentinitschlammvulkanen an der Mariana konvergierenden Plattengrenze um die Entstehung kurzkettiger organischer Säuren, H_2 und Methan und ihr Potenzial für ein mikrobielles Leben in diesen Schlammvulkanen zu untersuchen. Meine Ergebnisse zeigen an, dass hohe Mengen an H_2 , Formiat, Acetat und Methan durch serpeninitische Verwitterung des Mantelgesteins und der darunterliegenden subduzierenden Platte erzeugt werden und/oder ein indirektes Ergebnis davon sind. Dabei korrelieren Konzentrationen dieser Verbindungen mit Temperaturen an der subduzierenden Platte, und Formiat- und Acetatkonzentrationen in Porenwasser des Schlammes folgen einem exponentiellen Arrhenius-ähnlichen Verlauf, welcher mit der Temperatur an der subduzierenden Platte zunimmt. Im Gegensatz zu lakustrischem und marinem Sediment befindet sich das Formiat mit H_2 und HCO_3^- im thermodynamischen Gleichgewicht. Dadurch können die erhöhten Formiatkonzentrationen durch Äquilibrierung des Formats mit durch Serpentinisierung erzeugtem H_2 erklärt werden. Im Gegensatz dazu sind die Treiber für die erhöhten Acetat- und Methankonzentrationen unsicher. Auch wenn Berechnungen darauf hindeuten das mikrobieller Stoffumsatz thermodynamisch günstig ist, wurden keine Hinweise auf eine aktive mikrobielle Biosphäre entdeckt.

Auf Grundlage der hier präsentierten Ergebnisse ist es in Zukunft möglich, die Sequenztiefe der verfügbaren *fdhA*-Gene aus verschiedenen Umgebungen und Proben zu erhöhen. Dies wäre von Nutzen, um die Veränderung der relativen Häufigkeit in verschiedenen Sedimenttypen und Redox-Bedingungen zu untersuchen

und darauf zu schließen ob die Diversität auf den Redox-Zustand und den dominierenden terminalen katabolischen Prozess zurückzuführen ist, oder möglicherweise mit anderen Parametern wie Tiefe oder diagenetischem Status der organischen Materie korreliert. Eine experimentelle Bestätigung des hier präsentierten Vorschlags abiotischer serpentinitgesteuerter Acetatproduktion ist für die weitere Erforschung des Ursprungs des Lebens und für die Astrobiologie von Interesse, da Serpentinisierung auch auf anderen Planeten zu finden ist, und Acetat ein wichtiges Energiesubstrat für uns bekannte katabolische Reaktionen ist.