

Crenarchaeota

Ammonium-oxidierende Archaea

CHRISTA SCHLEPER
UNIVERSITÄT WIEN, ÖSTERREICH

Archaea gelten als Extremisten, doch seit fast 20 Jahren ist bekannt, dass Organismen einiger weniger Abstammungslinien ubiquitär in Böden und marinem Plankton vorkommen. Diese zum Phylum der Crenarchaeota gehörenden Mikroben zählen zu den häufigsten Organismen auf diesem Planeten, da sie bis zu 30 Prozent des Meeresplanktons ausmachen^[1].

■ Lange Zeit gab es keine Hinweise auf spezielle Stoffwechsellinien oder die ökologische Rolle der nicht-thermophilen Crenarchaeota. Dies änderte sich erst, als kürzlich durch metagenomische Studien, also durch Sequenzierung von direkt aus der Umwelt isolierten Nukleinsäuren, Gene in terrestrischen und marinen Proben identifiziert wurden, die für Untereinheiten einer potenziellen Ammonium-Monooxygenase kodieren^[2, 3].

Durch die Isolierung eines größeren genomischen Fragments aus einem Sandökosystem bei Darmstadt, das Gene für eine potenzielle A- und B-Untereinheit einer Ammonium-Monooxygenase neben einem ribosomalen RNA-Operon enthielt, konnten diese Schlüsselgene eindeutig phylogenetisch den Crenarchaeota zugeordnet werden^[4]. Die potenziellen Monooxygenasen der Archaea sind aufgrund ihrer Proteinsequenz jedoch ebenso entfernt mit Ammonium-Monooxygenasen (AMO) aus Bakterien verwandt wie mit partikulären Methan-Monooxygenasen (PMO). Daher war es nicht so einfach mög-

lich, auf die Funktion des kodierten Proteins zu schließen. Die Transkription der archaealen Gene war aber durch Zugabe von Ammonium *in situ*, also im Boden, induzierbar und unterschied sie damit von PMO-Genen^[4]. Die Kultivierung eines Archaeons aus einem marinen Aquarium in Seattle bestätigte und erweiterte den Befund aus der Metagenomik maßgeblich: *Nitrosopumilus maritimus* setzt – ebenso wie Ammonium-oxidierende Bakterien – fast stöchiometrisch Ammonium zu Nitrit um und wächst dabei autotroph^[5]. Basierend auf den Informationen aus der Metagenomik konnten die Autoren Oligonukleotide ableiten, um nach Genen für eine Ammonium-Monooxygenase zu suchen. Sie wurden fündig: Die *amo*-Gene von *N. maritimus* sind denen des marinen Planktons und auch den aus dem Boden isolierten archaealen Genen außerordentlich ähnlich^[5].

So wurden innerhalb kurzer Zeit durch Kultivierung eines Organismus in Kombination mit Kultivierungs-unabhängig erzeugten metagenomischen Datensätzen Hinweise auf

die weite Verbreitung einer neuen, Ammonium-oxidierenden Organismengruppe der Crenarchaeota erhalten.

Kritischer Schritt im Stickstoffkreislauf

Nitrifikation ist ein essenzieller Schritt im globalen Stickstoffkreislauf, durch den fixierte und mineralisierte Formen des organischen Stickstoffs der Denitrifikation zugeführt werden. Bei der Ammoniumoxidation, dem geschwindigkeitsbestimmenden ersten Schritt, wird Ammonium über Hydroxylamin zu Nitrit oxidiert, welches dann durch andere Organismen, die Nitritoxidierer, weiter bis hin zum Nitrat umgesetzt wird (**Abb. 1**).

Nitrifikation ist im Boden für die Stickstoffversorgung der Pflanzen von Bedeutung, da das gut lösliche Nitrat besser aufgenommen werden kann. Allerdings wird dieses auch leicht durch Regenwasser ausgewaschen und steht den Pflanzen damit nicht mehr zur Verfügung, sondern führt zur Eutrophierung von Grundwasser. Um den Stickstoff im Boden zu halten, wird den Düngemitteln daher oft ein Hemmstoff der Ammoniumoxidation zugesetzt.

Bislang waren nur zwei spezielle Gruppen von γ - und β -Proteobakterien bekannt, die Ammonium oxidieren können und dabei Kohlenstoff aus der Atmosphäre fixieren, also autotroph wachsen. Sie sind schwer im Labor kultivierbar, wachsen sehr langsam und kommen in relativ geringer Anzahl in der Natur vor. Dennoch werden in Böden beachtliche Umsatzraten von Ammonium in Nitrit gemessen. Könnte es sein, dass Archaea eine größere Rolle bei der Nitrifikation spielen als die bisher bekannten Bakterien?

Die Dominanz der Archaea – ...

Wir haben das quantitative Vorkommen der potenziell Ammonium-oxidierenden Bakterien (AOB) und Archaea (AOA) in verschiedenen Böden von Süd- bis Nordeuropa vermessen. Hierzu zählten leichte, also sandige, landwirtschaftlich genutzte Böden der griechischen Insel Santorini, schwerere natürliche und auch landwirtschaftlich genutzte Böden Mitteldeutschlands (mit und ohne Düngung) sowie typische, stark organische Böden von der Westküste Norwegens. Es wurden

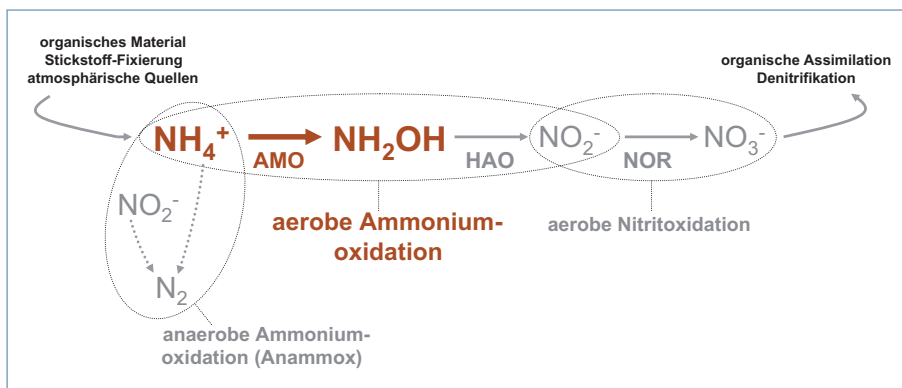


Abb. 1: Ammoniumoxidation: der erste und geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Nitrifikation^[6]. AMO: Ammonium-Monooxygenase, HAO: Hydroxylamin-Oxidoreduktase (bei Archaea unbekannt), NOR: Nitrit-Oxidoreduktase^[6].

spezielle PCR-Techniken für die quantitative Bestimmung von *amoA*-Genen der Bakterien und Archaea eingesetzt. Ohne Ausnahme dominierten in allen zwölf vermessenen Böden die archaealen Gene, und zwar bis zu 200fach in oberen Bodenschichten und in unteren Schichten sogar bis zu 3.000fach^[7]. Meist wurden zwischen 10 und 100 Millionen Kopien des *amoA*-Gens der Archaea pro Gramm getrockneten Bodens vermessen. Und gerade auch in unteren Bodenschichten, in denen die Zahlen für AOB drastisch abnahmen, wurden noch beachtlich hohe Werte für AOA gefunden. Die quantitative Vermessung von Transkripten in einigen dieser Böden nach Isolierung von RNA und reverser Transkription bestätigte, dass die Gene der Archaea tatsächlich auch in größeren Mengen abgelesen werden als die der Bakterien^[6]. Durch quantitative Vermessung von typischen archaealen Ether-Lipiden ließ sich außerdem eine Korrelation zwischen diesem Biomarker und den *amoA*-Genzahlen in fast allen Böden feststellen. Eine weitere unabhängige Messung wurde mithilfe der neuen Pyro-Sequenzierertechnologie durchgeführt, bei der DNA ohne vorherige Vermehrung (durch Klonierung oder PCR) analysiert werden kann. In einer 300.000 Sequenzen umfassenden cDNA-Genbank aus Boden konnte die höhere Zahl beziehungsweise die höhere transkriptionelle Aktivität der Ammonium-oxidierenden Archaea bestätigt werden^[7].

... aber wer macht den Job?

Es wird wahrscheinlich noch ein paar Jahre dauern, bis die Bedeutung dieser Befunde für natürliche Ökosysteme wie auch für die Landwirtschaft richtig eingeordnet werden kann. Denn noch ist nicht klar, ob die Ammonium-oxidierenden Archaea den größeren Teil der Ammoniumoxidation übernehmen, wie es die hohen Zahlen im Boden derzeit suggerieren, oder ob sie vielleicht aufgrund niedriger Umsatzraten doch nur eine untergeordnete Rolle spielen. Es wird auch zu klären sein, ob die Archaea eher in anaeroben Habitaten aktiv sind, eventuell besser als ihre bakteriellen Konkurrenten an niedrige pH-Werte adaptiert sind und ob sie auch auf organischen Kohlenstoffquellen wachsen können (mixotroph oder heterotroph). In Studien mit marinem Plankton wurde sowohl die Inkorporation von markiertem Kohlenstoff aus Kohlendioxid als auch aus Aminosäuren in Zellen der Crenarchaeota nachgewiesen. Aus der vollständig bestimmten Genomsequenz eines marinen Archaeons (*Cenarchaeum symbio-*

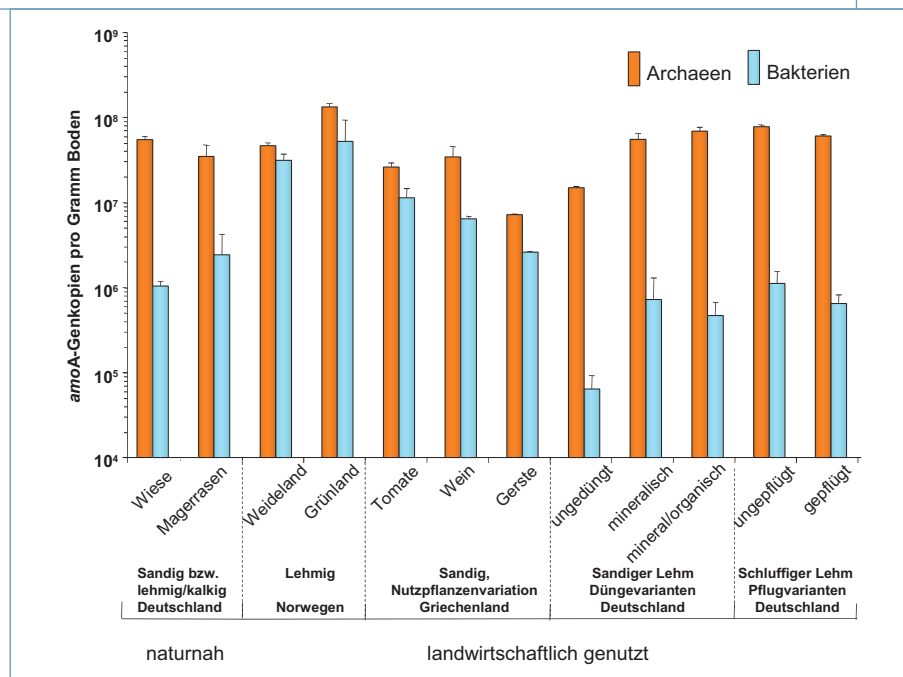


Abb. 2: Die Archaea sind unter uns: Zählung von Ammonium-Monooxygenase-Genen der Archaea und der Bakterien in Böden Westnorwegens, Deutschlands und Südgriechenlands mithilfe quantitativer PCR-Techniken. Die Archaea dominieren in allen untersuchten Böden und auch in tieferen Schichten^[7].

sum), das als Symbiont im Gewebe eines Schwamms gedeiht, lässt sich rekonstruieren, dass die moderaten Crenarchaeoten Kohlendioxid über den 3-Hydroxypropionat-Zyklus fixieren könnten, wie er bereits für die extrem thermophilen Verwandten beschrieben wurde^[8].

Für das weitere Studium der Ammonium-oxidierenden Archaea wird die Kultivierung von Organismen ebenso essenziell sein wie ökophysiologische Untersuchungen und Prozessmessungen in Böden unter Einsatz von Hemmstoffen und unterstützt durch molekularbiologische und mikroskopische Analysen. Gerade der Zusammenschluss aus klassischer, organismisch orientierter Mikrobiologie und modernen molekularen Analysen erscheint hier weiterhin besonders erfolgversprechend.

Schon jetzt aber lässt sich festhalten, dass der bereits recht komplexe Stickstoffkreislauf, wie wir ihn aus Lehrbüchern kennen, in Zukunft sicherlich noch mehrfach überarbeitet werden muss. ■

Literatur

- [1] Karner, M. B., DeLong, E. F., Karl, D. M. (2001): Archaeal dominance in the mesopelagic zone of the Pacific Ocean. *Nature* 409: 507–510.
- [2] Venter, J. C., Remington, K., Heidelberg, J. F., Halpern, A. L., Rusch, D., Eisen, J. A., Wu, D., Paulsen, I., Nelson, K. E., Nelson, W., Fouts, D. E., Levy, S., Knap, A. H., Lomas, M. W., Nealson, K., White, O., Peterson, J., Hoffman, J., Parsons, R., Baden-Tillson, H., Pfannkoch, C., Rogers, Y. H., Smith, H. O. (2004): Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. *Science* 304: 66–74.
- [3] Schleper, C., Jurgens, G., Jonuscheit, M. (2005): Genomic studies of uncultivated archaea. *Nat. Rev. Microbiol.* 3: 479–488.
- [4] Treusch, A. H., Leininger, S., Kletzin, A., Schuster, S. C., Klenk, H.-P., Schleper, C. (2005): Novel genes for nitrite

reductase and Amo-related proteins indicate a role of uncultivated mesophilic crenarchaeota in nitrogen cycling. *Environ. Microbiol.* 7: 1985–1995.

[5] Könneke, M., Bernhard, A. E., de la Torre, J. R., Walker, C. B., Waterbury, J. B., Stahl, D. A. (2005): Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon. *Nature* 437: 543–546.

[6] Nicol, G. W., Schleper, C. (2006): Ammonia-oxidizing Crenarchaeota: important players in the nitrogen cycle? *Trends Microbiol.* 14: 207–212.

[7] Leininger, S., Urlich, T., Schloter, M., Schwark, L., Qi, J., Nicol, G. W., Prosser, J. I., Schuster, S. C., Schleper, C. (2006): Archaea predominate among ammonia-oxidizing prokaryotes in soils. *Nature* 442: 806–809.

[8] Hallam, S. J., Mincer, T. J., Schleper, C., Preston, C. M., Roberts, K., Richardson, P. M., DeLong, E. F. (2006): Pathways of carbon assimilation and ammonia oxidation suggested by environmental genomic analyses of marine Crenarchaeota. *PLoS Biol.* 4: e95.

Korrespondenzadresse:

Prof. Dr. Christa Schleper
Wiener Ökologiezentrum
Universität Wien
Althanstraße 14
A-1090 Wien
Tel.: 0043-1-4277 54201
Fax: 0043-1-4277 9542
christa.chleper@univie.ac.at

AUTORIN



Christa Schleper

1993 Promotion am Max-Planck-Institut Martinsried und an der LMU München, 1995–1997 Postdoktorat am Californian Institute of Technology, Pasadena, und an der University of Santa Barbara, CA, USA, 1998–2004 Assistentin an der Technischen Universität Darmstadt, 2002 Habilitation, seit 2004 Professorin für Mikrobiologie an der Universität Bergen, Norwegen, seit Oktober 2007 Professorin für Ökogenetik an der Universität Wien, Österreich.