

## Tiefseeforschung: Anaerobe Oxidation von Methan durch eine mikrobielle Symbiose

Antje Boetius, Alfred-Wegener-Institut für Polar- und Meeresforschung, Bremerhaven, Max-Planck-Institut für Marine Mikrobiologie, Bremen, und International University Bremen (IUB)

► Methan (CH<sub>4</sub>) ist ein wichtiges Treibhausgas und entsteht in großen Mengen als eines der Endprodukte bei der mikrobiellen Zersetzung von organischem Material. Die Produzenten sind methanogene Archaea wie *Methanobacterium*, das CO<sub>2</sub> und H<sub>2</sub> zu Methan umsetzt, oder *Methanosarcina*, das zum Beispiel Acetat zersetzen kann (Abb. 1). Dieser anaerobe Prozess findet an Land vor allem in Feuchtbiotopen wie Sümpfen statt und stellt eine wichtige Quelle für Methan dar.

Im Meer entsteht Methan vor allem in den tieferen Sedimentschichten, wo wie an Land methanogene Archaea Wasserstoff oder andere Endprodukte der Zersetzung von organischen Stoffen zur Energiegewinnung nutzen.

Abb. 1: Beispiele für methanogene Reaktionen

$\text{CO}_2 + 4 \text{H}_2 \rightarrow \text{CH}_4 + 2\text{H}_2\text{O}$	Reduktion von CO <sub>2</sub>
$\text{CH}_3\text{OH} + \text{H}_2 \rightarrow \text{CH}_4 + \text{H}_2\text{O}$	Reduktion von Methanol
$4\text{HCOO}^- + 4\text{H}^+ \rightarrow \text{CH}_4 + 3 \text{CO}_2 + 2 \text{H}_2\text{O}$	Disproportionierung von Formiat
$\text{CH}_3\text{COO}^- + \text{H}^+ \rightarrow \text{CH}_4 + \text{CO}_2$	Disproportionierung von Acetat
$4\text{CH}_3\text{NH}_3^+ + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow 3\text{CH}_4 + \text{CO}_2 + 4 \text{NH}_4^+$	Disproportionierung von Methylamin

zen. Dennoch trägt der Ozean normalerweise kaum zur Emission von Methan in die Atmosphäre bei, da das Methan zumeist schon in den Sedimenten wieder oxidiert wird. An Land wird Methan von aeroben methanotrophen Bakterien mit Sauerstoff zu Kohlendioxid umgesetzt. Da Sauerstoff und andere energiereiche Elektronenakzeptoren im Meeresboden oft schon in einer Tiefe von wenigen Millimetern bis Zentimetern verbraucht sind, geschieht der größte Teil der Oxidation von Methan mit Sulfat, das im Meereswasser in hohen Konzentrationen vorkommt (durchschnittlich 28 mM). Dieser Prozess ist Geochemikern seit Jahrzehnten bekannt; dennoch ist es bisher nicht gelungen, einen Mikroorganismus zu isolieren, der Methan ohne Sauerstoff veratmen kann.

Ein erster wichtiger Hinweis für die Beteiligung von Archaea an der anaeroben Oxidation von Methan waren die Versuche von Zehnder und Brock (1979), die zeigten, dass bei der Produktion von Methan auch ein geringer Prozentsatz des Methans zu CO<sub>2</sub> und/oder Acetat oxidiert wird. Dennoch ließ die

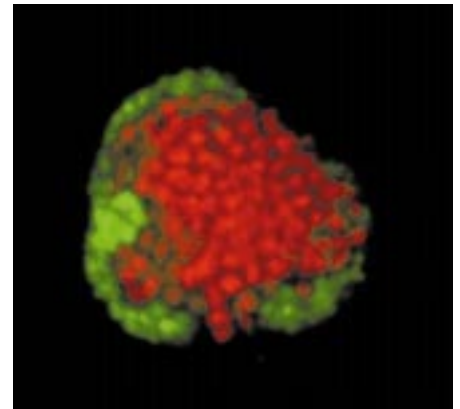
geringfügige Methanumsetzung wie auch der gemäß thermodynamischer Berechnungen extrem niedrige Energiegewinn nicht die Schlussfolgerung zu, dass Mikroorganismen von diesem Prozess leben können. Erst 1994 fand Tori Hoehler in Feldversuchen an der Küste von North Carolina, USA, einen wichtigen Hinweis für eine positive Energiebilanz bei der anaeroben Oxidation von Methan. Er spekulierte, dass Sulfatreduzierer gemeinsam mit methanogenen Archaea in der Lage seien, die Reaktionsbedingungen im Sediment so zu beeinflussen, dass die Methanogenen – anstatt Methan zu produzieren – in einer Umkehrreaktion das Methan mit Wasser oxidieren könnten (HOEHLER *et al.* 1994).

Dabei wird vorausgesetzt, dass die Sulfatreduzierer Wasserstoff oder Acetat als mögliche Zwischenprodukte so effizient aus der Umgebung der Archaea entfernen (mittels Oxidation mit Sulfat), dass für die Archaea ausreichend Energie aus der reversen Methanogenese entsteht.

### Entdeckung einer Symbiose aus Sulfatreduzierern und Archaea

Auf Einladung des GEOMAR-Forschungszentrums für marine Geowissenschaften in Kiel konnten wir im August 1999 an einer Expedition mit dem Forschungsschiff SONNE zum Kontinentalhang vor Oregon (USA) teilnehmen. Das Forschungsprogramm TEC-FLUX des GEOMAR beschäftigt sich mit dem dortigen Vorkommen an Gashydraten und untersucht die Prozesse der Bildung, Verteilung und Zersetzung des „brennenden Eises“ aus Methan ([www.gashydrate.de](http://www.gashydrate.de)). Am Untersuchungsstandort, dem „Hydratrücken“, wird ständig eine große Menge an Methan aus zerfallenden Gashydraten freigesetzt, da diese

Abb. 2: Symbiose aus Archaea und sulfatreduzierenden Bakterien. Solche Aggregate wurden in gashydrathaltigen Sedimenten vom Kontinentalhang vor Oregon, USA, gefunden. Das Bild wurde mit einem Konfokalen Laser-Scanning Mikroskop aufgenommen. Die Aggregate wurden mehrfach gefärbt: mit einer Grün-fluoreszierenden RNA-Sonde, die gegen eine spezifische Gruppe von Sulfatreduzierern gerichtet ist, sowie mit einer Rot-fluoreszierenden RNA-Sonde, die gegen eine spezifische Gruppe von Archaea (ANME-2) gerichtet ist. (Bild: Gieseke, Boetius; MPI)



bei einer Wassertiefe von weniger als 800 m und einer Temperatur von 8°C instabil sind.

Der hohe hydrostatische Druck verursacht, dass sich wesentlich mehr Methan im Wasser lösen kann als unter den Bedingungen an Land oder im Flachwasser. Daher konnte vermutet werden, dass an Methanquellen der ansonsten nahrungslimitierten Tiefsee besondere Methanoxidierer zu finden sind. Ein wichtiger Hinweis für die anaerobe Oxidation von Methan waren die hohen Biomassen von sulfidabhängigen, chemosynthetischen Mikro- und Makroorganismen am Hydratrücken (z. B. *Beggiatoa*-Matten oder die symbiotische Muschel *Calymene*). Es schien wahrscheinlich, dass die großen Mengen an Schwefelwasserstoff dort als direktes Produkt der anaeroben Oxidation von Methan mit Sulfat auftreten. Außerdem zeigte die Analyse der Isotopie verschiedener charakteristischer Biomassebestandteile (Biomarker) der Mikroorganismen, dass diese Methan aufgenommen und umgesetzt haben mussten.

Da über 99 Prozent der marinen Bakterien bisher nicht unter Laborbedingungen kultiviert werden konnten, wählten wir eine andere Methode: Die Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (FISH), mit der Bakterien je nach ihrer Zugehörigkeit zu verschiedenen taxonomischen Gruppen durch kleine Nucleinsäure-Sonden, die einen Fluoreszenzfarbstoff tragen, markiert werden können (PERNTHALER *et al.* 2001). Diese Methode hat den Vorteil, dass ganze Zellen im Mikroskop betrachtet und quantifiziert werden können, und zwar genau so wie sie in ihrer Umwelt vorkommen.

Als erstes fiel auf, dass in den methanhaltigen Sedimenten oberhalb der Gashydratmassen eines Archaea-Typs auftreten, meist

in Aggregaten aus 100 und mehr Zellen. Die Isotopensignatur ihrer typischen Lipide (Archaeole) zeigte deutlich, dass sie Methan aufgenommen haben mussten. Am spannendsten war der Befund, dass die Zellaggregate stets von sulfatreduzierenden Bakterien umwuchert sind, wie wir mit einer Doppelfärbung zeigen konnten (Abb. 2). Diese Aggregate aus Bakterien und Archaea kommen in den methanreichen Sedimenten des Hydratrückens mit Zellzahlen von bis zu 100 Millionen pro Milliliter Schlamm vor, also mit einer enormen Biomasse für einen Tiefsee-Standort. Eng gekoppelt an das Auftreten dieser Aggregate oberhalb der Gashydrate konnten wir extrem hohe Sulfatreduktionsraten messen. Damit war der erste mikroskopische Nachweis einer Symbiose aus Mikroorganismen gelungen, die Methan mittels Sulfat abbauen können und damit

eine wichtige Rolle im Methankreislauf des Meeres übernehmen (BOETIUS *et al.* 2000).

#### Die Struktur der Symbiose

Es sind bisher nur wenig strukturierte mikrobielle Symbiosen aus der Umwelt bekannt, obwohl schon eine Reihe von Prozessen gefunden wurden, die die Bildung von Konsortien voraussetzen (SCHINK *et al.* 1997). Seit der Verwendung von FISH in der Mikrobiologie zeigt sich, dass mikrobielle Symbiosen weitaus häufiger als angenommen auftreten, sogar als Bestandteil der Symbiose mit höheren Organismen (DUBILIER *et al.* 2001). Im Falle der anaeroben Oxidation von Methan liegt der Vorteil auf der Hand: Bei der thermodynamisch ungünstigen Energieausbeute des Prozesses scheint ein möglichst effektiver Austausch der Zwischenprodukte eine Vor-

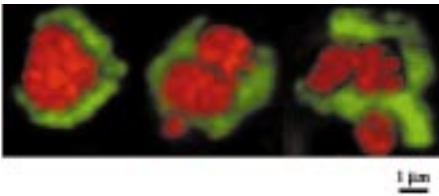
aussetzung für die Durchführbarkeit der Reaktion. Entsprechend fanden wir, dass die Aggregate einen recht geringen Durchmesser von weniger als zehn Mikrometern haben (im Mittel 3–4 µm) und dabei Zelle an Zelle dicht gepackt aneinander sitzen.

Dabei bilden die Archaea einen inneren Kern von durchschnittlich 100 Zellen, umgeben von einer Schale aus rund 200 Bakterien.

Theoretisch kommen eine Reihe von Austauschstoffen zwischen den Archaea und den sulfatreduzierenden Bakterien in

**Abb. 3: Mögliche Reaktionsschritte der anaeroben Oxidation von Methan. Nach HINRICHS und BOETIUS, im Druck**

$\text{CH}_4 + \text{SO}_4^{2-} \rightarrow \text{HCO}_3^- + \text{HS}^- + \text{H}_2\text{O}$	Nettoreaktion
1) Oxidation des Methan (Archaea) 2) Oxidation des Intermediats (SRB)	Mögliche Intermediate
1) $\text{CH}_4 + 2 \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CO}_2 + 4 \text{H}_2$ 2) $\text{SO}_4^{2-} + 4 \text{H}_2 + \text{H}^+ \rightarrow \text{HS}^- + 4 \text{H}_2\text{O}$	Wasserstoff
1) $\text{CH}_4 + \text{HCO}_3^- \rightarrow \text{CH}_3\text{COO}^- + \text{H}_2\text{O}$ 2) $\text{SO}_4^{2-} + \text{CH}_3\text{COO}^- \rightarrow \text{HS}^- + 2\text{HCO}_3^-$	Acetat
1) $2\text{CH}_4 + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CH}_3\text{COOH} + 4\text{H}_2$ 2a) $4 \text{H}_2 + \text{SO}_4^{2-} + \text{H}^+ \rightarrow \text{HS}^- + 4\text{H}_2\text{O}$ 2b) $\text{CH}_3\text{COOH} + \text{SO}_4^{2-} \rightarrow 2\text{HCO}_3^- + \text{HS}^- + \text{H}^+$	Acetat + Wasserstoff
1) $4\text{CH}_4 + 4\text{H}_2\text{O} \rightarrow 4\text{CH}_3\text{OH} + 4\text{H}_2$ (9) 2) $3\text{SO}_4^{2-} + 4\text{CH}_3\text{OH} \rightarrow 3\text{HS}^- + 4\text{HCO}_3^- + 4\text{H}_2\text{O} + \text{H}^+$	Methanol
1) $\text{CH}_4 + 3 \text{HCO}_3^- \rightarrow 4\text{HCOO}^- + \text{H}^+ + \text{H}_2\text{O}$ 2) $\text{SO}_4^{2-} + 4\text{HCOO}^- + \text{H}^+ \rightarrow \text{HS}^- + 4\text{HCO}_3^-$	Formiat



**Abb. 4. Methanoxidierende Archaea/Bakterien-Aggregate. In den meisten Sedimenten sind die Zellaggregate kleiner als zehn Mikrometer; größere Aggregate scheinen sich wieder in kleinere Kugeln aufzuteilen. Erklärung zur Zellfärbung siehe Abb. 2**

(Bild: Knittel, Boetius; MPI)

Frage, um den Isotopensignaturen der Symbiosepartner gerecht zu werden. Die Ordnung der *Methanosarcina* ist in der Lage, neben  $\text{CO}_2$  und  $\text{H}_2$  auch Acetat und andere  $\text{C}_1$ -Moleküle als Substrat für die Methanogenese zu verwenden. Nehmen wir eine Umkehrbarkeit dieser Reaktionen an, wie sie in Teilen schon nachgewiesen wurde, ist jedes dieser Substrate ein mögliches Intermediat (Abb. 3).

Ein interessantes Detail der mikroskopischen Beobachtungen ist, dass die Aggregate ab einer bestimmten Größe in mehrere Unteraggregate zu zerfallen scheinen, wobei die Sulfatreduzierer in den Kern der Archaea hineinwachsen (Abb. 4). Die Zellen sind dabei in eine organische Matrix gehüllt, die vom Ausmaß ungefähr dem Durchmesser des Zellaggregats entspricht und eventuell eine wichtige Rolle bei den Mineralisierungsprozessen spielt (Abb. 5). Die vergemeinschafteten Archaea wurden als Zugehörige einer neuen Gruppe identifiziert, deren Vorkommen erstmals an einer Methanquelle im Eel River-Becken vor der Küste Kaliforniens beschrieben wurde (HINRICHS *et al.* 1999) und die dort ebenfalls als methanabbauendes Konsortium auftreten (ORPHAN *et al.* 2001). Die symbiotischen, methanoxidierenden Archaea gehören zur Ordnung der *Methanosarcinales* und fallen in eine neue Untergruppe, die als „ANME-2“ bezeichnet wird. Mittels 16S-rDNA-Genbanken wurde ihr Auftreten inzwischen an einer Reihe verschiedener methanreicher Standorte entdeckt (RAVENSCHLAG, *unveröffentlichte Daten*).

Die sulfatreduzierenden Bakterien gehören zur Gruppe *Desulfosarcinal/Desulfococcus* der delta-Proteobakterien und fallen in einen neubeschriebenen Zweig von Sulfatreduzie-

ren, die einen bedeutenden Anteil der Sulfatreduzierer-Biomasse in arktischen Sedimenten ausmachen (RAVENSCHLAG *et al.* 2000), und auch als Symbiosepartner in einem Oligochaeten entdeckt wurden (DUBILIER *et al.* 2001).

Weder ein Vertreter der methanoxidierenden ANME-2 Gruppe, noch ein Bakterium des neuen *Desulfosarcina*-Clusters sind bisher kultiviert worden. Es ist uns aber gelungen, ein Mikrokosmos-System aufzubauen, mit dem unter verschiedenen Druck- und Temperaturbedingungen die anaerobe Oxidation von Methan im Labor untersucht werden kann (K. NAUHAUS und F. WIDDEL, *unveröffentlichte Daten*).

### Ein neues Forschungsprojekt zur mikrobiellen Methanumsetzung im Meer: MUMM

Mikrokosmos-Experimente zur anaeroben Oxidation von Methan wie auch eine Reihe weiterer Felduntersuchungen an verschiedenen methanreichen Tiefseestandorten werden derzeit im Rahmen unseres BMBF-geförderten Projektes MUMM (Mikrobieller Umsatz von Methan an gashydrathaltigen Standorten; Januar 2001 bis Dezember 2003) durchgeführt (<http://www.mpi-bremen.de/deutsch/biogeo/mumm2.html>). An MUMM beteiligen sich alle Abteilungen des MPI für Marine Mikrobiologie in Bremen sowie die Arbeitsgruppe Biogeochemie des Fachbereichs Geologie und die Projektgruppe Kohlenstoffkreislauf des Alfred-Wegener-Institutes für Polar- und Meeresforschung in Bremerhaven.

Ziel ist es, das Rätsel um den mikrobiellen Abbau von Methan ohne Sauerstoff im Meer zu lösen. Diesen Sommer haben wir an weiteren methanreichen Standorten nach den anaeroben methanotrophen Mikroorganismen gesucht, und sie an allen Typen von geologischen Methanquellen gefunden: im Golf von Mexiko in der Umgebung von Gashydraten, an Austritten von freiem Methangas (Schwarzes Meer) und an einem Schlammvulkan (Haakon Mosby Schlammvulkan, Barentssee). Mittels verschiedener Laborexperimente können wir die Umsetzungen des Methans durch die Symbiosen direkt nachweisen und die Kinetik der Methanumsetzung

unter verschiedenen chemischen und physikalischen Reaktionsbedingungen untersuchen. Diese Experimente sollen helfen, die Faktoren zu erkennen, die den Prozess der anaeroben Methanoxidation regulieren.

Diesen Prozess zu verstehen ist ungeheuer wichtig: die anaerobe Oxidation von Methan ist nach ersten Schätzungen eine ebenso große Senke für Methan wie die aerobe Methanoxidation an Land und leistet daher einen wichtigen Beitrag zum Methankreislauf und damit zum Klimahaushalt der Erde (HINRICHS und BOETIUS, *im Druck*).

### Literatur

- Boetius, A., Ravensschlag, K., Schubert, C., Rickert, D., Widdel, F., Gieseke, A., Amann, R., Jørgensen, B. B., Witte, U., Pfannkuche, O. (2000) A marine microbial consortium apparently mediating anaerobic oxidation of methane. *Nature* 407: 623–626
- Dubilier, N., Mülders, C., Ferdelman, T., de Beer, D., Pernthaler, A., Klein, M., Wagner, M., Erséus, C., Thiermann, F., Krieger, J., Giere, O., Amann, R. (2001) Endosymbiotic sulphate-reducing and sulphide-oxidizing bacteria in an oligochaete worm. *Nature* 411, 298–302
- Hinrichs, K.-U., Hayes, J. M., Sylva, S. P., Brewer, P. G., DeLong, E. F. (1999) Methane-consuming archaeobacteria in marine sediments. *Nature* 398: 802–805
- Hinrichs, K. U., Boetius, A. (2001) The anaerobic oxidation of methane: New insights in microbial ecology and biogeochemistry. In: Ocean Margin Systems, G. W. Wefer *et al.*, Eds., Springer-Verlag, Heidelberg, in press
- Hoehler, T. M., Alperin, M. J., Albert, D. B., Martens, C. S. (1994) Field and laboratory studies of methane oxidation in an anoxic marine sediments: evidence for methanogen-sulfate. *Glob Biogeochem Cycles* 8: 451–463
- Orphan, V. J., House, C. H., Hinrichs, K. U., McKeegan, K. D., DeLong, E. F. (2001) Methane-consuming archaea revealed by directly coupled isotopic and phylogenetic analysis. *Science* 293, 484–487
- Pernthaler, J., Glöckner, F. O., Schonhuber, W., Amann, R. (2001) Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) with rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Methods in Microbiology* 30, 207–226
- Ravenschlag, K., Sahm, K., Knoblauch, C., Jørgensen, B. B. und Amann, R. (2000). Community structure, cellular rRNA content and activity of sulfate-reducing bacteria in marine Arctic sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 3590–3600
- Schink, B. (1997) Energetics of syntrophic cooperation in methanogenic degradation. *Microb. Mol. Biol. Rev.* 61, 262–280

### Kontaktadresse

Dr. Antje Boetius  
Alfred Wegener Institute für Polar- und Meeresforschung  
Am Handelshafen 12, C-216  
D-27515 Bremerhaven  
Tel.: (0471) 4831 1518 oder  
Tel.: (0471) 2028 648  
eMail: [aboetius@awi-bremerhaven.de](mailto:aboetius@awi-bremerhaven.de)  
[www.awi-bremerhaven.de](http://www.awi-bremerhaven.de)  
[www.mpi-bremen.de](http://www.mpi-bremen.de)  
[www.iub-bremen.de](http://www.iub-bremen.de)

**Abb. 5: Größenspektrum der Aggregate. Hier wurden die Aggregate mit Acridine-Orange für die Epifluoreszenzmikroskopie gefärbt. Die Zellen erscheinen Gelbgrün, die äußere organische Hülle um die Aggregate ist Orange eingefärbt (unspezifische Bindung des Farbstoffs).** (Bild: Knittel, Boetius; MPI)

