

## Marine Mikrobiologie

# Der Stickstoffkreislauf im Ozean

MORITZ HOLTAPPELS, PHYLLIS LAM, MARCEL M. M. KUYPERS  
MAX-PLANCK-INSTITUT FÜR MARINE MIKROBIOLOGIE, BREMEN

### VAAM-Forschungspreis 2009

Ein neu entdeckter bakterieller Prozess, die anaerobe Oxidation von Ammonium zu gasförmigem Stickstoff (Anammox), ist verantwortlich für das Entweichen von biologisch verfügbarem Stickstoff aus dem Ozean und verändert unser herkömmliches Bild vom Stickstoffkreislauf im Meer.

A new microbial pathway, the anaerobic ammonium oxidation (Anammox) is widespread in the ocean and changes our view on the marine nitrogen cycle.

■ Stickstoff wird als essenzieller Bestandteil von Proteinen und DNA von allen Lebensformen benötigt. In weiten Teilen der Ozeane limitiert der Mangel an Stickstoff das Algenwachstum und beeinflusst damit entscheidend die Menge des Treibhausgases  $\text{CO}_2$ , die biologisch gebunden werden kann [1]. Angesichts der wichtigen Rolle der Ozeane für die globale  $\text{CO}_2$ -Bilanz sind detaillierte Kenntnisse über die Regulierung des marinen Stickstoffkreislaufs und dessen Kopplung mit dem globalen Kohlenstoffkreislauf erforderlich. Der Stickstoffkreislauf im Ozean wird im Wesentlichen durch mikrobielle Prozesse gesteuert. Die wichtigste Stickstoffquelle der marinen Biosphäre ist die biologische Fixierung molekularen Stickstoffs ( $\text{N}_2$ ) durch einige spezialisierte Bakterien ( $\text{N}_2 \rightarrow \text{N-organisch}$ ). Der so fixierte Stickstoff wird im Wechsel von organischen Ab- und Aufbauprozessen mehrfach wiederverwertet und liegt im Wasser als Ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ), Nitrit ( $\text{NO}_2^-$ ), Nitrat ( $\text{NO}_3^-$ ) oder organischer Stickstoff ( $\text{N}_{\text{org}}$ ) vor,

bis wiederum Bakterien (Denitrifizierer)  $\text{NO}_3^-$  zu  $\text{N}_2$  veratmen (Tab. 1). Damit wird fixierter Stickstoff dem System wieder entzogen. Die Denitrifikation, als ein fakultativ anaerober Prozess, findet man in marinen Sedimenten, unterhalb der sauerstoffhaltigen Sedimentoberfläche. Neben den Sedimenten sind besonders Regionen mit sauerstoffarmen Wassermassen (OMZ, Sauerstoff-Minimumzone) bedeutende Stickstoffsinken. OMZs entstehen bei einer erhöhten Primärproduktion im Oberflächenwasser, wenn die absinkenden Algen in den tiefer liegenden Wassermassen mikrobiell abgebaut werden, sodass dort der Sauerstoffgehalt auf Werte unter  $10 \mu\text{M}$  sinkt. Obwohl OMZs nur 0,1 Prozent des globalen Ozeanvolumens ausmachen, wird deren Anteil am gesamten Stickstoffverlust der Ozeane auf 20 bis 40 Prozent geschätzt [1, 2]. Die bedeutendsten OMZs finden sich dort, wo nährstoffreiche Tiefenwasser an die Oberfläche treten und die Primärproduktion ankurbeln: im östlichen Pazifik

vor den Küsten Chiles, Perus, Mexikos und den USA sowie im Arabischen Meer und vor der Küste Namibias (Abb. 1).

### Anammox: ein neuer Stoffwechselweg – eine neue Stickstoffsенke

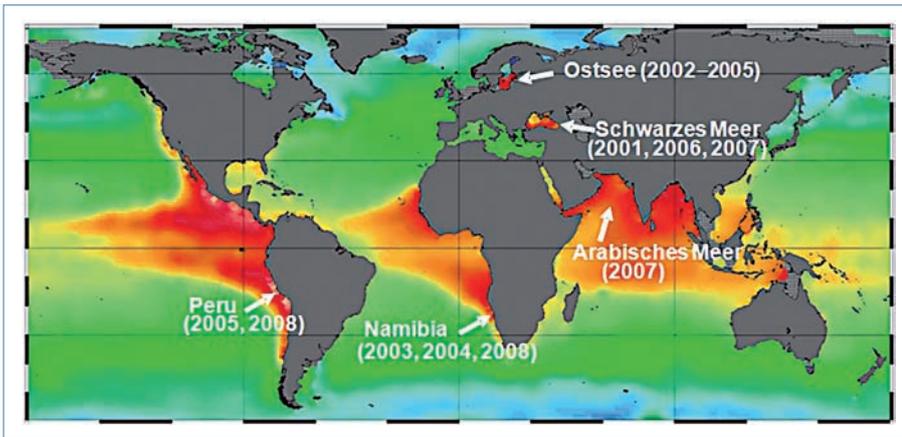
Noch vor einigen Jahren galt die Denitrifikation als einziger Stickstoffverlustprozess. Die Entdeckung eines neuen mikrobiellen Stoffwechselwegs, der anaeroben Ammoniumoxidation zu  $\text{N}_2$  (Anammox, Tab. 1), verdeutlichte eine weitere Stickstoffsенke. Das herkömmliche Bild des marinen Stickstoffkreislaufs musste revidiert werden. Dies zeigte eine Expedition unserer Gruppe zur namibischen OMZ im Jahre 2003 (Abb. 1) [3]. Wir inkubierten Wasserproben aus der OMZ mit verschiedenen Kombinationen aus  $^{14}\text{N}$ - und  $^{15}\text{N}$ -markiertem  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_3^-$  und  $\text{NO}_2^-$  und konnten so die Umwandlung von z. B.  $^{15}\text{NH}_4^+$  und  $^{14}\text{NO}_2^-$  zu  $^{29}\text{N}_2$  verfolgen und am Massenspektrometer quantifizieren. Während hohe Anammoxraten gemessen wurden, konnte keine Denitrifikation nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse wurden gestützt durch die Messung erhöhter Konzentrationen von Anammoxbakterien und Anammox-spezifischen Biomarkern (Ladderane). Dies war der erste direkte Nachweis von Anammox in einer OMZ. Weitere Expeditionen zu der wesentlich ausgeprägteren OMZ vor Peru bzw. vor der Küste Chiles (Abb. 1) zeigten auch dort erhöhte Anammoxraten [4, 5].

### Die Einbindung von Anammox in den Stickstoffkreislauf

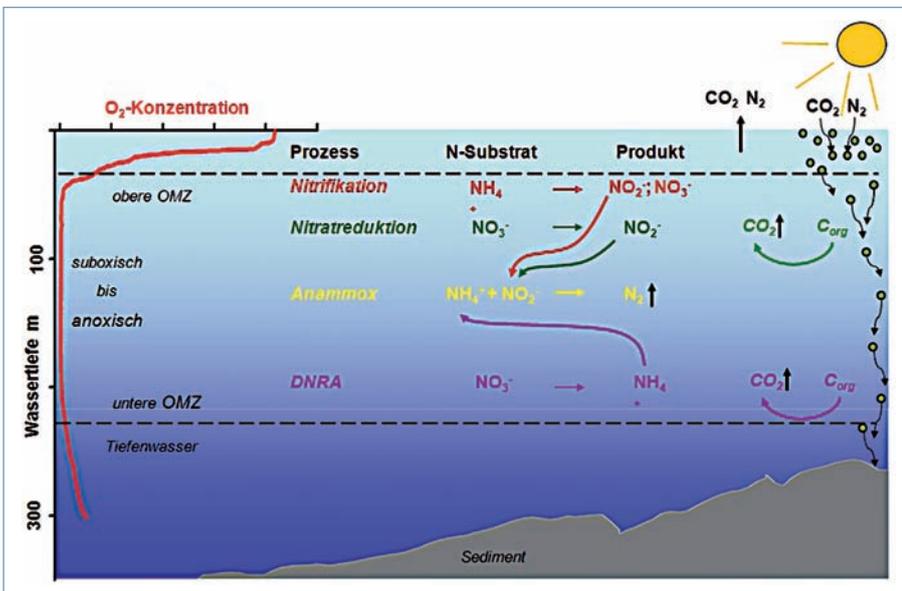
Während weitere Forschungsfahrten ins Schwarze und ins Arabische Meer (Abb. 1) die Bedeutung von Anammox als marine Stickstoffsенke bestätigten, blieb unklar, woher Anammoxbakterien ihr  $\text{NH}_4^+$  und  $\text{NO}_2^-$  beziehen (Tab. 1) und welche Konsequenzen sich aus ihrer Aktivität für den Kohlenstoffkreislauf ergeben. Anammox ist ein chemolithoautotropher Prozess, bei dem die  $\text{N}_2$ -Produktion die Energie für die  $\text{CO}_2$ -Fixierung liefert. Im Gegensatz zur heterotrophen Denitrifikation kommt es bei Anammox nicht zum Abbau organischer Verbindungen. Wie also funktioniert in den OMZs der Abbau organischer Verbindungen und damit die Freiset-

Tab. 1: Mikrobielle Prozesse im Stickstoffkreislauf.

Prozess	Reaktion	Sauerstoff	Kohlenstoffquelle
Denitrifikation	$\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO} \rightarrow \text{N}_2\text{O} \rightarrow \text{N}_2$	anaerob	meist heterotroph
Anammox	$\text{NH}_4^+ + \text{NO}_2^- \rightarrow \text{N}_2$	anaerob	autotroph
Nitratreduktion	$\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^-$	anaerob	heterotroph
Ammoniumoxidation	$\text{NH}_4^+ \rightarrow \text{NO}_2^-$	aerob	autotroph
Nitritoxidation	$\text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO}_3^-$	aerob	autotroph
DNRA	$\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NH}_4^+$	anaerob	heterotroph



▲ **Abb. 1:** Sauerstoffkonzentrationen im Ozean in 200 m Tiefe. Niedrige Konzentrationen (rot) kennzeichnen die Sauerstoff-Minimum-Zonen (OMZs), von denen einige mehrfach von unserer Gruppe untersucht wurden (Pfeile).



▲ **Abb. 2:** Querschnitt durch die peruanische Sauerstoff-Minimum-Zone (OMZ). Sauerstoff nimmt mit der Wassertiefe ab (rote Linie). Die  $N_2$ -Produktion mittels Anammox (gelb) ist gekoppelt an Nitratreduktion (grün), Nitrifizierung (rot) und dissimilatorische  $NO_3^-$ -Reduktion zu  $NH_4^+$  (DNRA, rosa). Ein Teil der Algenblüte (grüne Punkte) sinkt von der Wasseroberfläche in die Tiefe und wird mittels heterotropher Nitratreduktion und DNRA mineralisiert. Dabei wird  $CO_2$  freigesetzt.

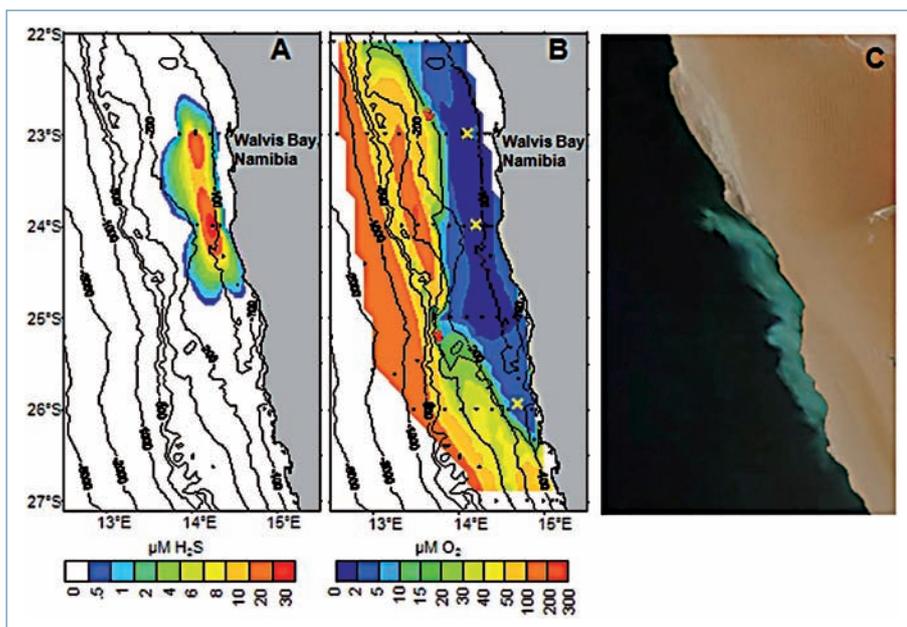
zung von  $NH_4^+$ , das essenziell für Anammox ist? Erste Antworten darauf erbrachte unsere Peru-Expedition im Jahr 2005 [6]: Eine Kombination aus Experimenten mit  $^{15}N$ -markierten Stickstoffverbindungen sowie der molekularbiologische Nachweis von Genexpressionen prozessrelevanter Proteine ergab ein neues, komplexeres Bild des Stickstoffkreislaufs in der peruanischen OMZ. Neben der hohen Aktivität von Anammox konnten wir zeigen, dass 67 Prozent des für Anammox benötigten  $NO_2^-$  aus der heterotrophen Nitratreduktion und 33 Prozent aus dem ersten Schritt der Nitrifizierung – der autotrophen, aeroben Ammoniumoxidation – stammten

(**Abb. 2**). Ein Teil des benötigten  $NH_4^+$  wurde durch den Abbau organischen Materials mittels Nitratreduktion und mikroaerophiler  $O_2$ -Respiration freigesetzt, während ein anderer Teil aus der dissimilatorischen  $NO_3^-$ -Reduktion zu  $NH_4^+$  (DNRA) stammt, womit erstmals DNRA im offenen Ozean nachgewiesen wurde. Die daraus resultierenden Konsequenzen für die Stickstoffbilanz sind gravierend: Nach traditionellen Berechnungen, mit Denitrifikation als alleiniger Stickstoffsенke, stammen 100 Prozent des verbrauchten Stickstoffs aus dem im Wasser vorhandenen  $NO_3^-$ . Unseren Berechnungen zufolge beträgt dieser Anteil nur 50 bis 60 Prozent. Der Rest des

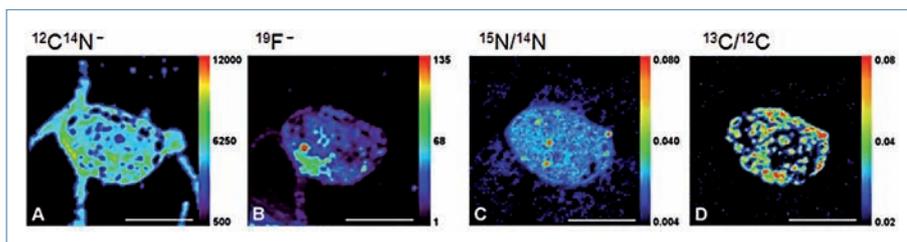
verbrauchten Stickstoffs stammt direkt aus der Mineralisierung organischer Verbindungen. Oft basieren klassisch errechnete Stickstoffverluste auf den verringerten  $NO_3^-$ -Konzentrationen der OMZs. Damit unterschätzen sie in hohem Maße den realen Stickstoffverlust. Daneben ergab die Vielzahl der beteiligten Prozesse wesentlich höhere Mineralisierungsraten als bisher angenommen. Es ist also wahrscheinlich, dass die  $N_2$ - und  $CO_2$ -Produktion in den OMZs weltweit wesentlich höher ist als gedacht. Angesichts global expandierender OMZs [7] erscheint uns eine fortlaufende Aktualisierung des Stickstoffkreislaufs und dessen Einbindung in globale biogeochemische Modelle wichtig, um vorherzusagen wie die eng gekoppelten marinen Stickstoff- und Kohlenstoffkreisläufe in Zukunft reagieren.

### Denitrifizierer entgiften schwefelwasserstoffhaltige Küstengewässer

Während sich herausstellte, dass nicht Denitrifikation, sondern Anammox die bedeutendste Stickstoffsенke in vielen OMZs ist, erlangten einige marine Denitrifizierer eine neue Bedeutung für das marine Ökosystem: Chemolithoautotrophe Bakterien reduzieren  $NO_3^-$  zu  $N_2$ , während sie giftigen Schwefelwasserstoff ( $H_2S$ ) zu harmlosem elementarem Schwefel (S) und Sulfat ( $SO_4^{2-}$ ) oxidieren.  $H_2S$  entsteht als Endprodukt der bakteriellen heterotrophen Sulfatreduktion, die hauptsächlich in den Sedimenten stattfindet. Hohe Abbauraten können zu einer Freisetzung von  $H_2S$  in die darüberliegende Wassersäule führen.  $H_2S$  ist für die meisten Organismen hochgiftig und kann in betroffenen Ökosystemen ein Massensterben von Flora und Fauna verursachen. Besonders die anthropogene Eutrophierung der Küstengewässer fördert eine Freisetzung von  $H_2S$  und bedroht damit auch wesentliche Nahrungsressourcen des Menschen. Wir konnten nun zeigen, wie in der namibischen OMZ eine etwa 7.000  $km^2$  große Fläche, bedeckt von  $H_2S$ -haltigem Wasser, durch eine Blüte autotropher Denitrifizierer entgiftet wurde [8] (**Abb. 3**). Die Denitrifizierer, bestehend aus zwei unterschiedlichen Populationen von Gamma- und Epsilonproteobakterien, machten rund 20 Prozent des Bakterioplanktons aus. Durch ihre entgiftende Aktivität entstand eine Pufferzone zwischen dem  $H_2S$ -haltigen Bodenwasser und dem sauerstoff- und fischreichen Oberflächenwasser. Da das Oberflächenwassers unbeeinträchtigt erscheint, vermuten wir, dass vielerorts die Freisetzung von  $H_2S$  im Bodenwasser und die



▲ **Abb. 3:** H<sub>2</sub>S-Freisetzungen vor der Küste Namibias in den Jahren 2004/05. **A,** H<sub>2</sub>S- und **B,** O<sub>2</sub>-Konzentrationen im Bodenwasser, 2 m über dem Sediment. **C,** Die Satellitenaufnahme zeigt die spezifische Färbung des Oberflächenwassers durch hohe Konzentrationen von elementarem Schwefel vor der Küste Namibias.



▲ **Abb. 4:** NanoSIMS-Aufnahme von *Chromatium okenii*. **A,** Die Isotopenhäufigkeiten von <sup>12</sup>C/<sup>14</sup>N kennzeichnen die Dichte des organischen Materials. **B,** Anhand der spezifischen Markierung mit dem Element Fluor kann die Zelle identifiziert werden. **C, D,** Nach Inkubationen mit <sup>13</sup>C- und <sup>15</sup>N-markierten Substraten zeigen hohe Isotopenverhältnisse von <sup>15</sup>N/<sup>14</sup>N und <sup>13</sup>C/<sup>12</sup>C die Orte erhöhter C- und N-Assimilation. Maßstab: 5 μm.

fatalen Folgen für die benthische Fauna übersehen werden. Die Häufigkeit dieser Ereignisse wird in den kommenden Jahren wahrscheinlich zunehmen. Es gibt deutliche Anzeichen dafür, dass die globale Erwärmung und die anhaltende Eutrophierung künftig zu einer verstärkten Hypoxie der Küstengewässer führen wird [9, 10].

### Bestimmung mikrobieller Aktivität auf Zellebene

Die Bedeutung mikrobieller Prozesse für die globalen Stoffkreisläufe ist unbestritten. Aber welcher Mikroorganismus katalysiert welchen Prozess? Die Antwort darauf erfordert eine Kombination unterschiedlicher Methoden. In der Regel werden Mikroorganismen mit molekularbiologischen Methoden, etwa durch Gendatenbanken und der Fluoreszenz-

*in situ*-Hybridisierung (FiSH) identifiziert und quantifiziert. Parallel dazu erfolgt die Messung ihrer Stoffumsatzraten, etwa durch Experimente mit <sup>15</sup>N- oder <sup>13</sup>C-markierten Substraten. Korrelieren die Ergebnisse, lässt sich auf die Aktivität bestimmter Mikroorganismen schließen. Kürzlich konnten wir unser Repertoire an Methoden erheblich erweitern. Durch technische Neuentwicklungen wie der hochauflösenden Sekundärionen-Massenspektrometrie (nanoSIMS) und einer Weiterentwicklung von FiSH können wir nun gleichzeitig die Aktivität und Identität einzelner Zellen bestimmen [11]. Mit nanoSIMS lassen sich die Isotopenverhältnisse von Kohlenstoff, Stickstoff und anderen Elementen mit hoher Auflösung in einzelnen Zellen messen. Damit können Assimilationsraten von <sup>13</sup>C- oder <sup>15</sup>N-markiertem Substrat auf der Zellebene

bestimmt werden. Gleichzeitig ist es möglich, die Zelle mit dem Halogen Fluor zu markieren und im nanoSIMS zu identifizieren. Diese neue Methode, von uns HISH-SIMS (Halogen-*in situ*-Hybridisation – secondary ion mass spectrometry) genannt, wurde zum ersten Mal mit Proben aus einem alpinen Bergsee getestet. Für drei anaerobe, phototrophe Bakterienarten, *Chlorobium clathratiforme*, *Lamprocystis purpurea* und *Chromatium okenii*, bestimmten wir die zellspezifischen Aufnahmeraten von markiertem H<sup>13</sup>CO<sub>3</sub><sup>-</sup> und <sup>15</sup>NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (**Abb. 4**). Wir stellten fest, dass die zellspezifischen Aufnahmeraten innerhalb der Arten erheblich fluktuieren. Besonders stark unterschieden sich aber die Aufnahmeraten zwischen den drei Arten. Obwohl *Chromatium okenii* nur mit 0,3 Prozent der Gesamtzellzahl vertreten war, betrug ihr Anteil an der Stickstoff- und Kohlenstoffaufnahme jeweils 40 und 70 Prozent. Zahlenmäßig unbedeutende Arten können also eine entscheidende Rolle im Stickstoff- und Kohlenstoffkreislauf spielen.

Derzeit ist umstritten, ob die Stickstoffbilanz der Ozeane im Gleichgewicht ist oder vielmehr der Stickstoffverlust durch Denitrifikation und Anammox den Stickstoffeintrag durch Flusseinträge und N<sub>2</sub>-Fixierung überwiegt. Eine genaue Bilanzierung hängt unter anderem davon ab, ob wir die relevanten Mikroorganismen identifizieren und ihre Stoffwechselaktivität bestimmen können. Es ist gut möglich, dass ein Großteil der N<sub>2</sub>-fixierenden Mikroorganismen noch unentdeckt ist. Mit HISH-SIMS haben wir gute Voraussetzungen, weitere Teilnehmer am Stickstoffkreislauf zu identifizieren.

### Danksagung

Wir danken Niculina Musat und Gaute Lavik für ihre fachliche Unterstützung sowie der Max-Planck-Gesellschaft und der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die Förderung der Forschungsprojekte. ■

### Literatur

- [1] Gruber N (2004) The dynamics of the marine nitrogen cycle and its influence on atmospheric CO<sub>2</sub> variations. In: Follows M, Oguz T (Hrsg) The ocean carbon cycle and climate. NATO ASI Series. Kluwer Academic, Dordrecht, 97–148.
- [2] Codispoti LA, Brandes JA, Christensen JP, Devol AH, Naqvi SWA, Paerl HW, Yoshinari T (2001) The oceanic fixed nitrogen and nitrous oxide budgets: Moving targets as we enter the anthropocene? *Scientia Marina* 65:85–105.
- [3] Kuypers MMM, Lavik G, Woebken D, Schmid M, Fuchs BM, Amann R, Jorgensen BB, Jetten MSM (2005) Massive nitrogen loss from the Benguela upwelling system through anaerobic ammonium oxidation. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:6478–6483.
- [4] Hamersley MR, Lavik G, Woebken D, Rattray JE, Lam P, Hopmans EC, Sinninghe Damsté JS, Krüger S, Graco M, Gutiérrez D, Kuypers MMM (2007) Anaerobic ammonium oxida-

dition in the Peruvian oxygen minimum zone. *Limnol Oceanogr* 52:923–933.

[5] **Thamdrup B, Dalsgaard T, Jensen MM, Ulloa O, Farias L, Escribano R** (2006) Anaerobic ammonium oxidation in the oxygen-deficient waters of northern Chile. *Limnol Oceanogr* 51:2145–2156.

[6] **Lam P, Lavik G, Jensen MM, van de Vossenberg J, Schmid M, Woebken D, Gutiérrez D, Amann R, Jetten MSM, Kuypers MMM** (2009) Revising the nitrogen cycle in the Peruvian oxygen minimum zone. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:4752–4757.

[7] **Stramma L, Johnson GC, Sprintall J, Mohrholz V** (2008) Expanding oxygen-minimum zones in the tropical oceans. *Science* 320:655–658.

[8] **Lavik G, Stuhmann T, Bruchert V, Van der Plas A, Mohrholz V, Lam P, Mussmann M, Fuchs BM, Amann R, Lass U, Kuypers MMM** (2009) Detoxification of sulphidic African shelf waters by blooming chemolithotrophs. *Nature* 457:581–586.

[9] **Beman JM, Arrigo KR, Matson PA** (2005) Agricultural runoff fuels large phytoplankton blooms in vulnerable areas of the ocean. *Nature* 434:211–214.

[10] **Sarmiento JL, Hughes TMC, Stouffer RJ, Manabe S** (1998) Simulated response of the ocean carbon cycle to anthropogenic climate warming. *Nature* 393:245–249.

[11] **Musat N, Halm H, Winterholler B, Hoppe P, Peduzzi S, Hillion F, Horreard F, Amann R, Jorgensen BB, Kuypers MMM** (2008) A single-cell view on the ecophysiology of anaerobic phototrophic bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:17861–17866.

#### Korrespondenzadresse:

Dr. Marcel M. M. Kuypers  
Dr. Phyllis Lam  
Moritz Holtappels  
Max-Planck-Institut für Marine  
Mikrobiologie  
Nutrient Gruppe  
Celsiusstraße 1  
D-28359 Bremen  
Tel.: 0421-2028-644/-647  
Fax: 0421-2028-690  
mkuypers@mpi-bremen.de  
plam@mpi-bremen.de  
mholtapp@mpi-bremen.de

## AUTOREN



### Marcel Kuypers

1988–1995 Studium der organischen Chemie an der Universität Nijmegen, Niederlande. 1996–2000 Promotion am Royal Netherlands Institute for Sea Research, Niederlande. 2001–2003 Postdoc am Max-Planck-Institut für Marine Mikrobiologie. 2003–2005 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Max-Planck-Institut für Marine Mikrobiologie. Seit 2005 Gruppenleiter der Nutrient Gruppe.



### Phyllis Lam

Bis 1998 Studium der Ozeanographie und marinen Biologie in Southampton, UK. 1998–2004 Promotion an der Universität von Hawaii, USA. 2005–2008 Postdoc am Max-Planck-Institut für Marine Mikrobiologie. Seit 2008 Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Max-Planck-Institut für Marine Mikrobiologie.



### Moritz Holtappels

1998–2004 Studium der biologischen Meereskunde und Biophysik an der Universität Rostock. 2004–2005 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Lehrstuhl für Biophysik der Universität Rostock. Seit 2005 Doktorand am Max-Planck-Institut für Marine Mikrobiologie.