

Vielseitigkeit von *Methanosarcina* und Probleme bei der Domestizierung und Kultivierung

Geschrieben von Vanja Michel

Betreuer: Kurt Hanselmann

Abstract:

Um die Kultivierung von *Methanosarcina spp.* auf festem Substrat zu vereinfachen, wurde von Metcalf et al. (2) ein Inkubator entwickelt, welcher es ermöglicht mit 119 oder sogar 153 Petri-Schalen gleichzeitig zu arbeiten. Ausserdem beschrieben sie ein Vorgehen, welches angewendet werden kann, um diesen Inkubator innerhalb einer anaeroben Kammer zu verwenden, bei welchem am Anfang ein Gasgemisch von $N_2 / CO_2 / H_2S$ (Verhältnis 79.9:10:0.1) und am Schluss ein Gemisch von $N_2 / CO_2 / H_2$ (Verhältnis 75:20:5) verwendet wird.

Das Genom von *M. acetivorans* wurde (von J.E. Galagan et al., 2002, 3) vollständig sequenziert und analysiert. Eine andere Studie analysierte das aussergewöhnliche Wachstum von *M. acetivorans* auf Kohlenmonoxid (4). Die daraus hervorgehenden Informationen zeigten das Vielseitige Wachstum von *Methanosarcina*, welches Methan über den Wasserstoff-Weg, den methylotrophischen Weg und den Acetat-Weg bilden kann. Es stellte sich heraus, dass die Verwendung von CO als Substrat zur Bildung von Acetat und Fumarat führte und weniger Methan produziert wurde. Dies führt zur Annahme, dass Kohlenmonoxid als Inhibitor der Methanogenese wirkt.

Einleitung:

In meiner Fallstudie wollte ich mehr über die methanogenen Archaea *Methanosarcina* erfahren. Diese Gruppe erweckte mein Interesse, weil sie unter den Archaea, welche noch ziemlich schlecht untersucht sind, hervorsticht, indem sie sehr vielfältig ist. So habe ich mich gefragt, was die Schwierigkeiten bei der Kultivierung von *Methanosarcina* sind, und wie diese Probleme gelöst werden können. Dabei konzentrierte ich mich vor allem auf eine Möglichkeit, diese Arten im grossen Massstab zu kultivieren, was für die Forschung von grossem Interesse und Vorteil ist. Die Gruppe der *Methanosarcina* ist eine interessante Gruppe unter den methanogenen Archaea, da sie die grösste Diversität an Methan Metabolismen aufweist. Deshalb habe ich mich gefragt, auf welchen verschiedenen Substraten *Methanosarcina* wachsen kann. Die Arten der Gattung **Methanosarcina** gehören zur Familie der **Methanosarcinaceae**, zur Ordnung der **Methanosarcinales**, zur Klasse der **Methanomicrobia**, zum Phylum der **Euryarchaeota** und zur Domäne der **Archaea**. (1, eine Liste der Arten findet sich unter

<http://www.dsmz.de/microorganisms/html/archaea.genus/methanosarcina.html>)

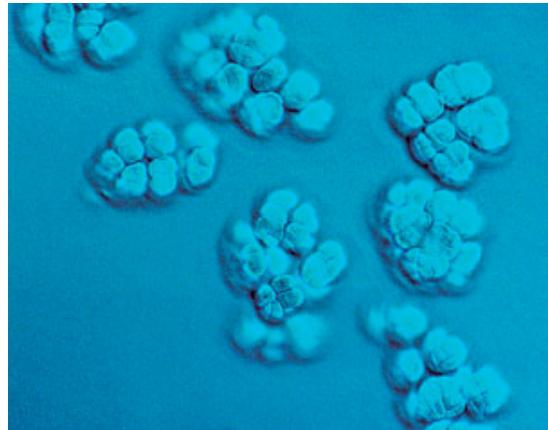


Abb. 1: **Lebende Kultur von *M. acetivorans***: es sind mehrzellige Ansammlungen zu sehen

Vorgehen:

Da die *Methanosarcina* strikt anaerob sind, wie alle methanogenen Organismen, besteht ein grosses Problem bei der Kultivierung dieser Arten darin, eine genügend sauerstofffreie Umgebung zu schaffen, in welcher sie überleben können. Lange war keine Möglichkeit bekannt, viele Petri-Schalen gleichzeitig zu behandeln. Im Jahr 1997 wurde aber von W.W. Metcalf, J.K. Zhang und R.S. Wolfe ein Inkubator entwickelt, der die Kultivierung der *Methanosarcina* Arten vereinfacht. (2)

Um die ausserordentlichen Eigenschaften einiger Arten der Gattung *Methanosarcina* zu verdeutlichen habe ich verschiedene Berichte zu diesem Thema gelesen und mich besonders mit den verschiedenen Möglichkeiten des Wachstums dieser Gruppe beschäftigt. Die Sequenzierung des Genoms von *Methanosarcina acetivorans* führte hier zu vielen Erkenntnissen und gibt Auskunft über die für Methanogene ungewöhnliche Vielseitigkeit an Substraten, auf welchen diese Art wachsen kann. (3, 4) Die Informationen zur Beantwortung meiner Fragen fand ich hauptsächlich in Berichten, welche im Internet frei zugänglich sind, indem ich auf der Seite "NCBI Literature Databases" (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Literature/>) unter PMC, PubMed Central, nach interessanten und auf mein Thema bezogenen Artikeln suchte

Ergebnisse:

Inkubator für die Kultivierung von *Methanosarcina* (2)

Um die Kultivierung von *Methanosarcina* auf Agar Platten zu vereinfachen, entwickelten W. W. Metcalf, J. K. Zhang und R. S. Wolfe einen Inkubator, indem sie eine Luftschleuse abänderten. Diese ist für die Verwendung in einer anaeroben Kammer gedacht. Ein sorgfältiges und genaues Vorgehen zur Verhinderung von Kontakt mit Sauerstoff ist nötig, da die Arten von *Methanosarcina* wie auch die anderen Methanogene strikt anaerob und daher äusserst sauerstoffempfindlich sind. Die Luftschleuse, welche die Autoren der Studie verwendeten, war rechteckig und besass zwei Öffnungen, Ventile und einen Vakuummesser (für die genauen Abmessungen aller Teile siehe Originalbericht 2). Eine der beiden Öffnungen verschlossen sie mit einer Acrylplatte, für die andere Öffnung entwickeln sie ein System, um die Acryltür gegen die Gummidichtung zu drücken und so einen Austritt von Gas zu verhindern. Dazu mussten sie einige Schrauben weglassen und durch Klammern ersetzen. Auf allen Seiten der Tür wurden Drehschlösser befestigt, welche in die U-förmigen Klammern passen und es so möglich machen, die Tür luftdicht zu verschliessen. Für die Versiegelung der verschiedenen Öffnungen wurde ein Porenschliessmittel aus Silikon verwendet.

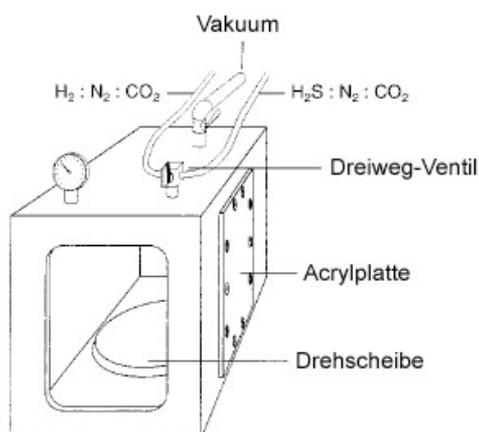
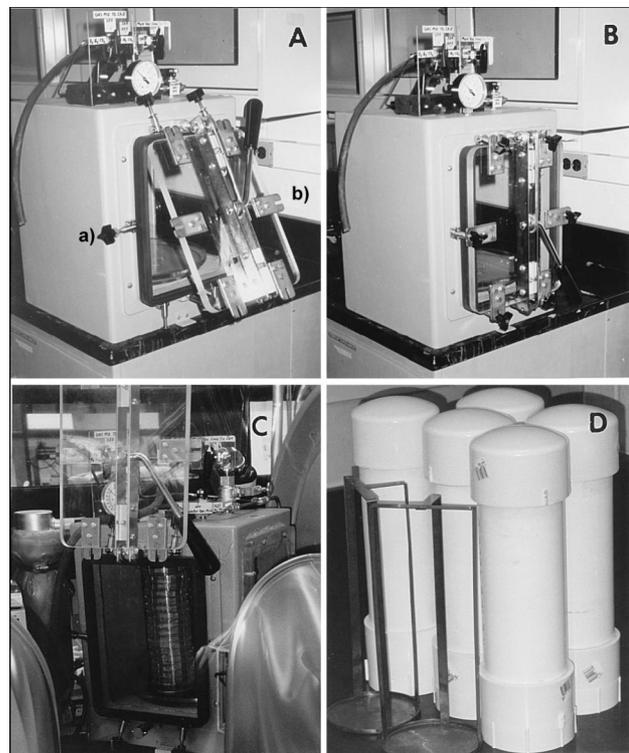


Abb. 2: Luftschleuse, welche verwendet wurde, um den Inkubator zu bauen

Um Gase hineinlassen zu können, wurde der Anschluss der Luftschleuse durch ein Dreiwegventil ersetzt. Eine Öffnung dieses Ventils verbanden sie mittels eines Kupferrohrs mit einem externen Zylinder, welcher 79.9% N₂, 10% CO₂ und 0.1% H₂S enthielt. Die andere Öffnung wurde mit einem Zylinder mit 75% N₂, 20% CO₂ und 5% H₂ verbunden. Eine geheizte Kupferbürste sorgte dabei dafür, dass allfälliger Sauerstoff reduziert wurde. Danach wurde die Vakuum Pumpe mit jeweils einer PVC Röhre mit dem Innenraum des Inkubators und mit einem Abzug verbunden (um das entzogene Gas abzuführen). Damit gut mit den behandelten Petri-Schalen gearbeitet werden kann und jene einfach herauszunehmen sind, wurde eine Drehscheibe auf einem Kugellager im inneren des Inkubators installiert. Somit können 119 Petri-Schalen auf sieben Metallablagen gleichzeitig im Inkubator behandelt werden. Wenn die Drehscheibe weggelassen wird, reicht der Platz sogar für 153 Petri-Schalen. Um den Inkubator zu verwenden, werden die Petri-Schalen hineingelegt, die Tür verschlossen und die Luft wird bis zu einem negativen Druck von 0.5 atm (-50 kPa) abgesaugt. Darauf werden die Drehschlösser geschlossen und der Inkubator wird bis

Abb. 3: **A/B: Inkubator** mit offener bzw. geschlossener Tür. Eingezeichnet sind unter anderem: a) Drehschloss b) U-förmige Klammern **C: Inkubator** installiert in einer anaeroben Kammer **D: Platzhalter**



etwa zum Druck Null mit N₂ / CO₂ / H₂S gefüllt. Dieser Vorgang wird sieben Mal wiederholt. Beim letzten Mal sollte ein kleiner negativer Druck beibehalten werden. Wenn man die Platten herausnehmen will, entzieht man erneut das Gasgemisch bis zu einem Druck von -50 kPa und füllt die Kammer mit N₂ / CO₂ / H₂. Dies wird 13 Mal wiederholt. Wenn zum letzten Mal das Vakuum erreicht ist, werden die Drehschlösser gelockert und es wird soviel N₂ / CO₂ / H₂ hinzugefügt, bis die Tür problemlos aufgeht. In ihren Versuchen brauchten diese drei Wissenschaftler ein Gasgemisch mit H₂S, da bis jetzt alle methanogenen Archaea H₂S zu brauchen scheinen, wenn sie auf festem Medium kultiviert werden. Übrigbleibendes H₂S entfernten sie mittels Aktivkohle. Wenn der Inkubator nicht vollständig gefüllt wird, können Platzhalter verwendet werden, um verwendetes Gas zu sparen. (siehe auch Abb.2 D)

Vielseitige Wachstumsmöglichkeiten (3, 4)

Für alle methanogenen Organismen spielt die Bildung von Methan eine essenzielle Rolle. Doch nicht bei allen Gruppen von Methanogenen treten mehrere verschiedene Arten der Methanbildung auf, und so haben sie zum Teil eine beschränkte Auswahl an Substraten, auf denen sie wachsen können. Hier bildet die Gruppe der *Methanosarcina* eine Ausnahme. Dazu gehören nämlich Organismen, welche auf alle bisher bekannten Arten Methan herstellen und dadurch auch auf den entsprechenden Substraten wachsen können. Bisher kennt man Organismen, welche unter Verwendung von drei Stoffgruppen wachsen. Die einen verwenden Acetat, welches sie über Acetyl-CoA zu Methan verarbeiten. Andere benutzen für ihr Wachstum als Substrat CO_2 und H_2 (dies ist weit verbreitet unter den Methanogenen). Das CO_2 wandeln sie nach vielen Zwischenstufen letztendlich auch in CH_4 um. Eine dritte Möglichkeit ist die Verwendung von Methylaminen, Methylsulfiden oder Methanol zur Herstellung von Methan über das Zwischenprodukt Methyl-CoM. Alle diese Substrate können von *Methanosarcina* Arten genutzt werden.

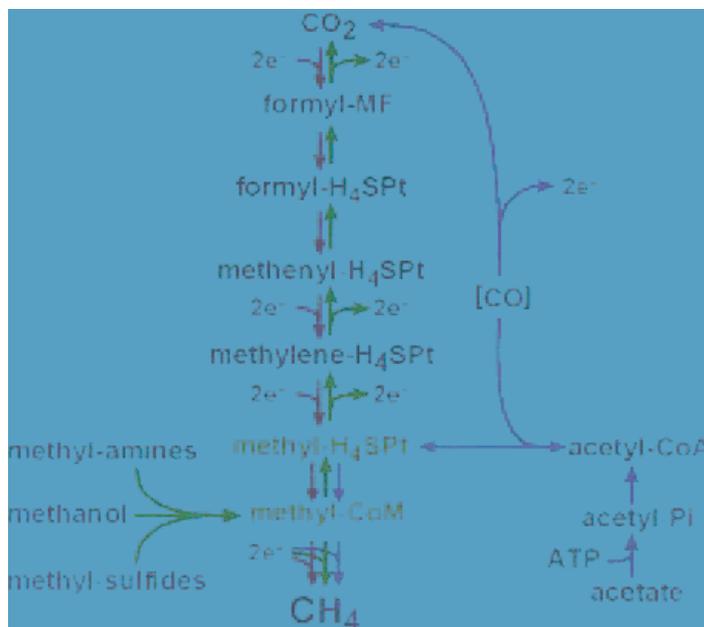


Abb. 4: **Verschiedene Methanogenese-Pathways:** in dieser Abbildung sieht man, welche Stoffe zur Methanbildung verwendet werden können. Blau dargestellt ist der so genannte "acetoclastic pathway", Grün der "methylotrophic pathway" und Rot der "hydrogen pathway".

Die Art *Methanosarcina acetivorans* ist ein besonderes Beispiel bezüglich dieser Vielseitigkeit. Schon ihre Genomgröße deutet darauf hin, dass sie viel breitere Möglichkeiten zum Wachstum hat als andere Vertreter der Archaea (*M. acetivorans* hat ein Genom von 5,751,492 bp). Dies ist das grösste bekannte Genom unter den Archaea und das viertgrösste Genom aller sequenzierten Prokaryoten. In diesem Genom fand man ungefähr 200 Gene, welche mit der Methanogenese zusammenhängen. *M. acetivorans* hat sowohl zwei oder drei Kopien derjenigen Gene, welche für die Methanogenese mit Acetat nötig sind, als auch derjenigen für die Verwendung von Methanol, Monomethylamin, Dimethylamin und Trimethylamin. Aufgrund der Abwesenheit einiger Hydrogenasen ist diese Art jedoch nicht in der Lage, CO_2 und H_2 als Substrat zu nutzen. Im Genom von *M. acetivorans* fand man weitere Gene welche darauf hindeuten, dass noch weitere Substrate möglich wären, welche aber bis anhin nicht bekannt sind.

Die wohl ungewöhnlichste Art von Wachstum bei *M. acetivorans* ist die Verwendung von Kohlenmonoxid als Substrat. Gerade für den Menschen ist die Umwandlung von CO wichtig, da dieser Stoff schon in geringer Konzentration toxisch wirkt. Bis ins Jahr 2004 waren nur 2 methanogene Arten bekannt, welche CO als Substrat nutzen können, nämlich *Methanothermobacter thermoautotrophicus* und *Methanosarcina*

barkeri. Das Vorkommen von CO-Dehydrogenasen bei *M. acetivorans* deutete aber darauf hin, dass auch diese Art Kohlenmonoxid verwenden kann. Durch eine Studie wurde gezeigt, dass *M. acetivorans* so kultiviert werden kann, dass es mit CO als limitierendem Stoff wächst. Nach einer Gewöhnung an dieses Wachstum nahm die Geschwindigkeit bei Abnahme des CO-Partialdrucks ab. Dabei wurde aber nicht so viel Methan produziert wie man eigentlich erwartet hätte, was auf andere Produkte hinwies. Die Wissenschaftler, welche diese Studie durchführten, fanden heraus, dass neben Methan Acetat und Fumarat die Hauptprodukte waren. Je mehr CO vorhanden war, desto weniger Methan und desto mehr Fumarat und Acetat wurden produziert.

Diskussion:

Die Forschung der Archaea ist in einigen Bereichen noch viel weniger weit als beispielsweise die Forschung der Wirbeltiere oder auch der Bakterien. Deshalb ist die Entwicklung des Inkubators zur Large-Scale Kultivierung von sehr grosser Bedeutung, da sie die Forschungsarbeiten stark vereinfacht und so den Weg für ein besseres Verständnis dieser interessanten Organismen bereitet. Zudem kann die Kultivierung im grossen Rahmen dabei helfen, die bisherigen Kenntnisse der Methanogenese zu verbessern.

Die Sequenzierung des Genoms von *M. acetivorans* ist ein erster Schritt zu einem besseren Verständnis der vielseitigen Gruppe der *Methanosarcina*, zu welcher unter anderem auch thermophile und halophile Arten gehören. Obwohl das ganze Genom sequenziert ist, gibt es noch viele offene Fragen für zukünftige Forscher. Zum Beispiel gibt es Gene welche andeuten, dass bei *M. acetivorans* noch andere Wachstumsweisen auftreten, welche bis heute nicht bekannt sind. Die Fähigkeit von *M. acetivorans* auf Kohlenmonoxid zu wachsen, könnte in der Aufbereitung von toxischem CO von Nutzen sein. Dieser Organismus könnte gebraucht werden, um bei Reaktionen, welche zwangsweise CO produzieren, dieses in Acetat, Fumarat und Methan weiter zu entwickeln. Das Problem bei dieser Aufgabe ist die Sauerstoff Sensibilität. Wahrscheinlich gibt es einfachere chemische Methoden, oder Organismen die einfacher zu handhaben sind, um Kohlenmonoxid abzubauen.

Die Tatsache, dass bei steigender CO Konzentration weniger Methan gebildet wurde deutet sehr stark darauf hin, dass das Kohlenmonoxid die Methanogenese inhibiert. Bei Anwesenheit einer genügenden Konzentration (bzw. eines genügend hohen Partialdrucks) werden bevorzugt andere Produkte gebildet und die Biosynthese von Methan nimmt ab.

Quellenverzeichnis

1. M.T. Madigan und J.M. Martinko, 2006, Brock, Biology of Microorganisms, Eleventh Edition, Appendix 2, S. A-5

2. W.W. Metcalf, J.K. Zhang und R.S. Wolfe, An Anaerobic, Intrachamber Incubator for Growth of *Methanosarcina* spp. on Methanol-Containing Solid Media, APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, Feb. 1998, p. 768–770

3. J.E. Galagan, C. Nusbaum et al., 2002, The Genome of *M. acetivorans* Reveals Extensive Metabolic and Physiological Diversity, *Genome Res.* 2002 12: 532-542, kann unter www.genome.org herunter geladen werden

4. M. Rother und W.W. Metcalf, 2004, Anaerobic growth of *Methanosarcina acetivorans* C2A on carbon monoxide: An unusual way of life for a methanogenic archaeon, <http://www.pnas.org/cgi/content/abstract/101/48/16929>

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: **E. Conway de Macario and A.J.L. Macario**, gefunden auf <http://www.rps.psu.edu/0405/pathways.html>

Abb. 2: **W.W. Metcalf, J.K. Zhang und R.S. Wolfe**, 1998, An Anaerobic, Intrachamber Incubator for Growth of *Methanosarcina* spp. on Methanol-Containing Solid Media, *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, Feb. 1998, p. 768–770 und alle dort aufgeführten Quellen

Abb. 3: ebenda

Abb. 4: **J.E. Galagan, C. Nusbaum et al.**, 2002, The Genome of *M. acetivorans* Reveals Extensive Metabolic and Physiological Diversity, *Genome Res.* 2002 12: 532-542

Anhang:

Zusätzliches Material:

Die Gattung *Methanosarcina* ist eine sehr interessante und vielseitige Gruppe der Archaea und auf dem Internet findet sich eine Vielzahl an spannenden Artikeln zu den verschiedensten Themen... Hier einige Beispiele:

Wuchsform von *Methanosarcina* spp. bei erhöhter Osmolarität:

K.R. Sowers, J.E. Boone, und R.P. Gunsalus, 1993, Disaggregation of *Methanosarcina* spp. and Growth as Single Cells at Elevated Osmolarity, *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, Nov. 1993, p. 3832-3839

Lipid Strukturen von *Methanosarcina* spp.:

G.D. Sprott et al., Hydroxydiether Lipid Structures in *Methanosarcina* spp. and *Methanococcus voltae*, *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, Mar. 1993, p. 912-914

Halotoleranz:

K.R. Sowers und R.P. Gunsalus, 1995, Halotolerance in *Methanosarcina* spp.: Role of *N*^ε-Acetyl-β-Lysine, α-Glutamate, Glycine Betaine, and K⁺ as Compatible Solutes for Osmotic Adaptation, *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, Dec. 1995, p. 4382–4388