

Präbiotische Ammoniaksynthese

Eine mögliche präbiotische Bildung von Ammoniak aus molekularem Stickstoff auf Eisensulfidoberflächen**

Mark Dörr, Johannes Käßbohrer, Renate Grunert,
Günter Kreisel,* Willi A. Brand, Roland A. Werner,
Heike Geilmann, Christina Apfel, Christian Robl und
Wolfgang Weigand*

Professor Wolfgang Beck und Professor Wolfgang Seidel
gewidmet

Die Bildung von Ammoniak aus Distickstoff ist in der Theorie des chemoautotrophen Ursprungs des Lebens eine noch ungeklärte Frage. Man nimmt an, dass die Bildung von Ammoniak aus Distickstoff, die in der belebten Natur durch eisen- und schwefelhaltige Enzyme katalysiert wird, in präbiotischer Zeit auf das Reduktionspotential von Eisensulfid zurückgeführt werden kann, das zu Pyrit umgesetzt wird.^[1]

[*] Prof. Dr. W. Weigand, Dipl.-Chem. M. Dörr, Dipl.-Ing. (FH) C. Apfel,
Prof. Dr. C. Robl

Institut für Anorganische und Analytische Chemie
Universität Jena

August-Bebel-Straße 2, 07743 Jena (Deutschland)

Fax: (+49) 3641-948102

E-mail: c8wewo@uni-jena.de

Prof. Dr. G. Kreisel, Dr. J. Käßbohrer, Dipl.-Ing. (FH) R. Grunert
Institut für Technische und Umweltchemie

Universität Jena

Lessingstraße 11, 07743 Jena (Deutschland)

Fax: (+49) 3641-948402

E-mail: guenter.kreisel@uni-jena.de

Dr. W. A. Brand, Dr. R. A. Werner, H. Geilmann

Max-Planck-Institut für Biogeochemie

Winzerlaer Straße 10, 07745 Jena (Deutschland)

[**] Wir danken Prof. H. Schnöckel, Prof. D. Sellmann, Prof. K. O. Stetter,
Prof. G. Wächtershäuser für hilfreiche Diskussionen, Dr. R. Russow
(UFZ Halle) für die Stickstoffanalyse und M. Sammler für ihre Hilfe
beim Aufbau und der Bedienung der Versuchs-Apparatur. Unsere
Arbeit wurde durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (SFB
436/A8) und den Fonds der Chemischen Industrie finanziert; ihnen
sei unser Dank ausgesprochen.

Stickstoff-fixierende Bakterien produzieren aus molekularem Luftstickstoff etwa 1.7×10^8 t Ammoniak pro Jahr.^[2] Diese Reaktion wird von Nitrogenase-Enzymen katalysiert und läuft unter milden Bedingungen bei Atmosphärendruck (10^5 Pa) und Umgebungstemperatur (273–323 K) ab. Die Einzelheiten des Reaktionsmechanismus sind noch weitgehend unbekannt und Gegenstand intensiver Diskussion in der Wissenschaft.^[3] Kürzlich wurde eine hochauflösende Röntgen-Einkristallstrukturanalyse des Nitrogenase-FeMo-Proteins aus *Azotobacter vinelandii* beschrieben.^[4] Das FeMo-Protein enthält den FeMo-Cofaktor, der aus zwei Cuban-ähnlichen Eisen-Schwefel-Einheiten $[4\text{Fe}:3\text{S}]$ und $[\text{Mo}:3\text{Fe}:3\text{S}]$ aufgebaut ist, die durch Sulfidliganden verbrückt sind. In dem von ihnen umschlossenen Hohlraum ist ein leichtes Atom – wahrscheinlich Stickstoff – koordiniert. Die weit verbreiteten und häufig auftretenden Elemente Eisen und Schwefel spielen also eine wichtige Rolle bei der Stickstoff-Fixierung und in der lebhaft diskutierten Theorie des chemoautotrophen Ursprungs des Lebens in einer urzeitlichen Eisen-Schwefel-Welt.^[1,5]

Hier beschreiben wir eine Methode, NH_3 aus N_2 unter Verwendung von H_2S als Reduktionsmittel in Anwesenheit von frisch gefälltem Eisensulfid herzustellen. Diese Reaktion könnte ein präbiotischer Vorläufer der Nitrogenase-Enzyme sein. Sowohl das Reduktionsmittel als auch die Reaktionsbedingungen (Atmosphärendruck des Stickstoffs und Temperaturen zwischen 70 und 80 °C) ähneln denen in biologischen Prozessen und sind damit sehr mild. Die treibende Kraft der Gesamtreaktion ist die Oxidation des Eisensulfids zu Eisendisulfid und die Bildung von Wasserstoff aus H_2S .^[6]

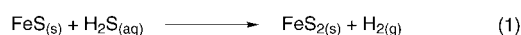
Hazen et al. berichten über die Reduktion von elementarem Stickstoff zwischen 300 und 800 °C und 0.1 bis 0.4 GPa.^[7] Der molekulare Wasserstoff, der für die Reaktion benötigt wurde, wurde aus Wasser erzeugt: Hierzu verwendeten die Autoren ein System aus Magnetit/Ameisensäure oder elementares Eisen als Reduktionsmittel. Unter den beschriebenen Reaktionsbedingungen könnte nach Ansicht von Hazen et al. diese Reaktion auf der urzeitlichen Erde abgelaufen sein.

Neben wichtigen molekularbiologischen und mikrobiologischen Untersuchungen^[8] wurden viele Modellverbindungen entwickelt, um die Funktionsweise der Nitrogenase untersuchen und verstehen zu können. Diese Modelle beruhen oft auf niedermolekularen Metallkomplexen oder Metallhydroxiden. Beachtenswerte Untersuchungen zur Fixierung von molekularem Stickstoff an Modellverbindungen wurden von Shilov und Bazhenova durchgeführt:^[9] Wässrige Suspensionen von Mo^{III} -, Ti^{II} -, V^{II} -, Mn^{II} - und Ta^{III} -hydroxiden sind in der Lage, N_2 bei ca. 10^7 Pa zu reduzieren. Nennenswerte Ausbeuten konnten mit Mischungen aus V^{II} - und Mg^{II} -hydroxiden erzielt werden. Eisenhydroxide reduzierten N_2 jedoch unter den gewählten Bedingungen nicht. Die höchsten Umsätze wurden von Folkesson und Larsson beschrieben, die einen Catecholat- V^{II} -Komplex – in Methanol bei ca. 1.5×10^6 Pa – verwendeten.^[10]

Zahlreiche Experimente zur N_2 -Reduktion in nichtwässrigem Milieu wurden seit den ersten Arbeiten von Chatt et al. unternommen.^[11,12] Eine schrittweise Reduktion von End-on-koordiniertem Distickstoff über Diazenido- und

Hydrazido-Zwischenstufen wurde beschrieben.^[13] Sellmann et al. synthetisierten einen Dieisendiazan-Komplex mit zwei fünfzähligen $[\text{NS}_2]$ -Liganden und charakterisierten ihn durch Röntgenstrukturanalyse.^[14–17] Diazen gilt als mögliche Zwischenstufe bei der Stickstoff-Fixierung. So konnte ein alternatives Modell zur Ammoniakbildung aus N_2 und H_2 in der Koordinationssphäre von Metall-Schwefel-Komplexen entwickelt werden.^[15] Coucouvanis et al. berichteten über Strukturanaloga der MoFe_3S_3 -Untereinheit des Nitrogenase-Cofaktors und diskutierten die Insertion von Distickstoff in eine Fe-Fe-Bindung.^[18]

Bei unseren Arbeiten wird das moderate, aber genügend hohe Reduktionspotenzial des Eisensulfids gemäß Reaktion (1) genutzt, um Ammoniak nach der Gesamtreaktion (2) herzustellen (Schema 1).^[19] Thermodynamischen Berechnun-



$$\Delta G^\circ = -38.6 \text{ kJ/mol}, E^\circ = -600 \text{ mV}, \text{pH} = 6.5$$



Schema 1. Synthese von Ammoniak unter Verwendung von Eisensulfid und Schwefelwasserstoff.

gen zufolge ist das Redoxsystem $\text{FeS-H}_2\text{S/FeS}_2$ geeignet, gelösten molekularen Stickstoff zu Ammoniak zu reduzieren.^[20]

Unseres Wissens wurden bisher noch keine erfolgreichen Versuche unternommen, molekularen Stickstoff in wässriger Lösung bei Normaldruck und Temperaturen unter 90 °C in Gegenwart von Eisensulfid zu Ammoniak zu reduzieren.^[20]

Die Aktivierungsenergie des molekularen Stickstoffs ist hoch, kann jedoch durch Bindung des N_2 an eine katalytisch

aktive Oberfläche merklich gesenkt werden. Deshalb betrachten wir die spezifischen Oberflächeneigenschaften des frisch gefällten Eisensulfides als ausschlaggebend für die N_2 -Fixierung. Mit handelsüblichem oder gealtertem Eisensulfid erfolgte keine Ammoniakbildung. Die Oberfläche des frisch gefällten Eisensulfids kann als eine große Bibliothek verschiedener Fe-S-Einheiten angesehen werden, von denen einige N_2 fixieren und reduzieren können. Wir nehmen an, dass der molekulare Stickstoff auf der Eisensulfidoberfläche chemisorbiert und anschließend schrittweise unter sauren Bedingungen protoniert wird. Um hinreichende Mengen Ammoniak zur Analyse zu erhalten, wurde die Reaktion in größerem Maßstab durchgeführt (Abbildung 1).

Eine Eisensulfidsuspension wurde durch Fällung von FeSO_4 mit Na_2S in Wasser bei Raumtemperatur unter Argonatmosphäre hergestellt. Das frisch gefällte Eisensulfid zeigte unter dem Rasterelektronenmikroskop eine zerklüftete Oberfläche. Durch Zusatz einer verdünnten H_2SO_4 -Lösung wurde der pH-Wert auf 3 bis 4 eingestellt; dabei entwickelte sich H_2S . Anschließend wurde hoch gereinigter Stickstoff etwa zwei Wochen lang durch die Suspension mit einer Flussrate von 0.5 L h^{-1} geleitet.

Um alle störenden stickstoffhaltigen Verbindungen (z.B. NO, NO₂, N₂O und NH₃) weitgehend zu entfernen, wurde der eingesetzte Stickstoff zunächst einer vierstufigen Reinigungsprozedur unterzogen (Abbildung 1): 1. N₂-Gasreiniger, 2. KMnO₄/H₂SO₄-Lösung, 3. 10M KOH, 4. 0.1N H₂SO₄. Das gebildete Ammoniak wurde anschließend durch Zusatz von NaOH freigesetzt und im Argonstrom (5 Lh⁻¹) in eine hochreine verdünnte H₂SO₄-Lösung überführt. Auch das Argon wurde vor der Verwendung durch die vierstufige Reinigungskaskade geleitet. Die Bestimmung des Ammoniaks erfolgte durch einen handelsüblichen quantitativen Test (Merck). Die Bildung von Ammoniak war gut reproduzier-

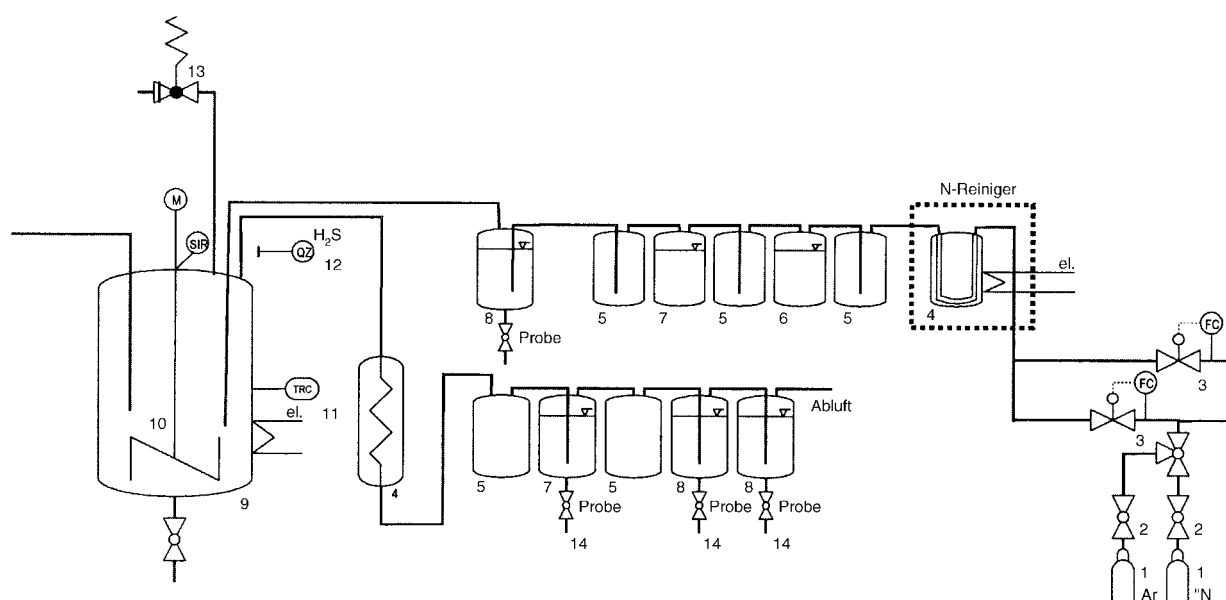


Abbildung 1. Flussschema der Ammoniak-Versuchsapparatur. 1) Gasflaschen, 2) Druckregler, 3) Durchflussregler, 4) N₂-Gasreiniger (Valco Instr. Inc.), 5) Sicherheitswaschflaschen, 6) oxidierendes Waschen: saure KMnO₄-Lösung, 7) alkalisches Waschen: KOH, 8) saures Waschen: 0.001 N H₂SO₄, 9) 15-L-Reaktionsgefäß, 10) Rührer, 11) Temperaturregler, 12) H₂S-Sensor, 13) Sicherheitsventil, 14) NH₄⁺-Kontrolle.

bar. Die Oxidation von Sulfid zu Disulfid führte zur Bildung von Eisendisulfid, welches durch Röntgenpulverdiffraktometrie nachgewiesen wurde.

Zahlreiche Blindversuche zeigten, dass es ohne Eisensulfid zu keiner nennenswerten Ammoniakbildung kommt. Nur sehr geringe Spuren von Ammoniak konnten nachgewiesen werden, wenn in Anwesenheit von Eisensulfid Argon anstelle von Stickstoff eingesetzt wurde. Diese Mengen waren jedoch beträchtlich kleiner ($< 10\%$) als bei der Reaktion mit N_2 .

Ein sicherer Nachweis zur Bildung von Ammoniak aus Distickstoff konnte durch die Verwendung von ^{15}N -markiertem Distickstoff erbracht werden ($\delta^{15}N = 138\%$).^[21] Die Isotopen-Massenspektrometrie (IRMS) zeigte eine signifikante Anreicherung der ^{15}N -Isotope in dem gebildeten $(NH_4)_2SO_4$.^[22–24] Das durch die Anreicherung erhöhte Isotopenverhältnis lag bis zu 61% über dem natürlichen $^{15}N/^{14}N$ -Verhältnis. Die gemessene Anreicherung war niedriger als erwartet. Dies kann durch allgegenwärtige Spuren von Ammoniak in den Edukten erklärt werden. Unser Ergebnis übersteigt die mögliche natürliche Schwankung in der $^{15}N/^{14}N$ -Isotopenverteilung um den Faktor 10.

Bezogen auf 3 mol Eisensulfid beträgt die Ammoniakausbeute 0.1% (3 mmol). Die Ammoniakausbeute bezüglich des eingesetzten Stickstoffs abzuschätzen scheint nicht sinnvoll, da die Reaktion mit Distickstoff aus experimentellen Gründen nicht in einem geschlossenen System durchgeführt werden konnte. Untersuchungen zur zeitabhängigen Änderung der Reaktivität sind im Gange. Unter Berücksichtigung der langen Reaktionszeiten und der großen auf der urzeitlichen Erde vorhandenen Mengen an Eisensulfid und Schwefelwasserstoff könnte eine Synthese von Ammoniak, ähnlich der von uns hier beschriebenen, in deutlichem Maße zum Ammoniakhaushalt beigetragen haben. Der von uns vorgestellte Syntheseweg fügt sich ohne weiteres in die Theorie des chemautotrophen Ursprungs des Lebens ein und könnte als Modell für ein präbiotisches, Stickstoff-fixierendes System herangezogen werden.

Experimentelles

Eisen(II)-sulfat-heptahydrat (834.1 g, 3 mol) und Natriumsulfid-nona-hydrat (720.6 g, 3 mol) werden jeweils in 3 L sauerstofffreiem Wasser bei Umgebungstemperatur gelöst. Dieses wird dadurch erhalten, dass hoch reines Argon 24 h bei 80 °C durch entionisiertes Wasser strömt. Die beiden Lösungen werden bei Umgebungstemperatur gemischt und anschließend auf 80 °C erhitzt. Um alle stickstoffhaltigen Verbindungen zu entfernen, wird mit NaOH (10 M) der pH-Wert der schwarzen Eisensulfidsuspension auf 13 erhöht und diese anschließend acht Tage unter konstantem Argonstrom (5 L h^{-1}) auf 80 °C erhitzt. Anschließend wird der pH-Wert mit verdünnter H_2SO_4 -Lösung auf 4 gesenkt. Hochreiner molekularer Stickstoff wird sieben Tage durch die Suspension geleitet (0.5 L h^{-1}). Der während der Reaktion ausgetriebene Schwefelwasserstoff wird durch Neubildung aus dem Eisensulfidniederschlag im sauren Milieu ersetzt; der pH-Wert wird während der ganzen Reaktionszeit zwischen 3 und 4 konstant gehalten. Abschließend wird der pH-Wert mit einer wässrigen NaOH-Lösung auf 13 erhöht. Das entstehende Ammo-

niak wird im Argonstrom aus der Suspension entfernt und in einer verdünnten H_2SO_4 -Lösung (0.001 N) aufgefangen. Das Wasser wird verdampft, und das so zurückbleibende Ammoniumsulfat kann direkt für die IRMS-Experimente eingesetzt werden. Diese wurden mit einem Delta-Plus-XL-Massenspektrometer (Finnigan MAT, Bremen) durchgeführt. Die Röntgenpulverdiffraktogramme wurden mit FeK_{α} -Strahlung aufgenommen, um Röntgenfluoreszenzeffekte zu minimieren.

Eingegangen am 16. Oktober 2002,

veränderte Fassung am 31. Januar 2003 [Z50371]

Stichwörter: Eisen · Isotopenmarkierung · Schwefel · Stickstoff · Stickstoff-Fixierung

- [1] G. Wächtershäuser, *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **1992**, 58, 85–201.
- [2] M. Appl, *Ammonia: Principles and Industrial Practice*, 1. Aufl., Wiley-VCH, Weinheim, **1999**.
- [3] B. E. Smith, *Science* **2002**, 297, 1654–1655.
- [4] O. Einsle, F. A. Tezcan, S. L. A. Andrade, B. Schmid, M. Yoshida, J. B. Howard, D. C. Rees, *Science* **2002**, 297, 1696–1700.
- [5] G. Wächtershäuser, *Microbiol. Rev.* **1988**, 52, 452–484.
- [6] E. Drobner, H. Huber, G. Wächtershäuser, D. Rose, K. O. Stetter, *Nature* **1990**, 346, 742–744.
- [7] J. A. Brandes, N. Z. Boctor, G. D. Cody, B. A. Cooper, R. M. Hazen, H. S. Yoder, Jr., *Nature* **1998**, 395, 365–367.
- [8] B. K. Burgess, D. J. Lowe, *Chem. Rev.* **1996**, 96, 2983–3011.
- [9] T. A. Bazhenova, A. E. Shilov, *Coord. Chem. Rev.* **1995**, 144, 69–145.
- [10] B. Folkesson, R. Larsson, *Acta Chem. Scand. Ser. A* **1979**, 33, 347–357.
- [11] M. D. Fryzuk, S. A. Johnson, *Coord. Chem. Rev.* **2000**, 200, 379–409, zit. Lit.
- [12] J. Chatt, A. J. Pearman, R. L. Richards, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* **1977**, 1852–1860; J. Chatt, J. R. Dilworth, R. L. Richards, *Chem. Rev.* **1978**, 78, 589–625.
- [13] R. L. Richards, *Coord. Chem. Rev.* **1996**, 154, 83–97, zit. Lit.
- [14] D. Sellmann, A. Hennige, *Angew. Chem.* **1997**, 109, 270–271; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, 36, 276–278.
- [15] D. Sellmann, J. Sutter, *Acc. Chem. Res.* **1997**, 30, 460–469.
- [16] D. Sellmann, J. Utz, N. Blum, F. W. Heinemann, *Coord. Chem. Rev.* **1999**, 192, 607–627.
- [17] D. Sellmann, A. Fürsattel, *Angew. Chem.* **1999**, 111, 2142–2145; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, 38, 2023–2026.
- [18] D. Coucouvanis, J. Han, N. Moon, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 216–224.
- [19] W. Weigand, G. Kreisel, J. Kässbohrer, M. Sammler, R. Grunert, Procedure for the production of ammonia, DE 98-19846242 **1998** [*Chem. Abstr.* **1998**, 132, 239002].
- [20] M. A. A. Schoonen, Y. Xu, *Astrobiology* **2001**, 1, 133–142.
- [21] Die Isotopenverhältnisse werden in der Delta-Notation (in Promill) als relative Abweichung einer Probe (sa) zur Referenz (ref) angegeben: $\delta[\text{‰}] = (R_{sa}/R_{ref} - 1)1000$. Für Stickstoff wird das $^{15}N/^{14}N$ -Verhältnis ($= R_{ref}$) in Luftstickstoff als Bezugspunkt verwendet.
- [22] W. A. Brand, *J. Mass Spectrom.* **1996**, 31, 225–235.
- [23] R. A. Werner, B. A. Bruch, W. A. Brand, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1999**, 13, 1237–1241.
- [24] R. A. Werner, W. A. Brand, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2001**, 15, 501–519.