



UPPSALA
UNIVERSITET

Metanogener och utnyttjandet av deras metanproduktion

Carina von Knorring

Independent Project in Biology
Självständigt arbete i biologi, 15 hp, vårterminen 2008
Institutionen för biologisk grundutbildning, Uppsala universitet

Innehållsförteckning

Sammandrag	1
Inledning	2
Arkéer	2
Fylogeni	3
Metanogener	5
Morfologi	5
Habitat	6
Metabolism	7
Vätgas, enkla alkoholer och en-kolföreningar som energikälla	7
Sulfatreducerande bakterier tävlar ut metanogener	8
Produktion av metan	8
Utnyttjandet av metanogener och metan	10
Kärnkraftverk	10
Biogas	11
Jordbruk	12
Diskussion	14
Tack	15
Referenser	16

Sammandrag

Arkéer är den tredje domänen som upptäcktes av Carl Woese i slutet av 1970-talet. Arkéerna visar en del likheter med bakterier och eukaryoter men även många skillnader. Arkéerna finns överallt i vår miljö och är väldigt viktiga, men det är få som vet om att de existerar. Det har identifierats fyra undergrupper, Crenarchaeota, Euryarchaeota, Nanoarchaeota och Korarchaeota. Den största gruppen inom Euryarchaeota är metanogenerna. Metanogenerna skiljer sig från andra arkéer eftersom de har en specifik energimetabolism där slutprodukten är metan. De är ofta beroende av fermenterade bakterier för att få tag i sin energikälla. De fermenterande bakterierna bryter ner organiska polymerer till bland annat acetat, H_2 och CO_2 som metanogenerna använder sig av. Metanogenernas habitat varierar; risfält, rötthammare, våtmarker, våmmen hos växtätande djur och i mag- och tarmkanalen hos människorna m fl. Det finns inga som är kända patogener, vilket nog är en orsak till att inte så många hört talas om dem.

Metanogenernas slutprodukt är metan, som är en växthusgas och bidrar till växthuseffekten, vilket är en anledning till att det är viktigt att studera metanogenerna närmare. Jordbruket är en av de största bidragande orsakerna till metan i atmosfären från metanogener där mänsklig aktivitet är orsaken. I jordbruket kommer metan från idisslande djur, till största delen från uppstötningar och väderspänningar men även från gödsel från djuren. En andra bidragande orsak är risfält där plantorna sätts under vatten så att en anaerob miljö skapas som krävs för metanogenerna. Ju fler människor på jorden som behöver mat, desto mer boskap och risfält får vi, och desto mer metan i atmosfären. Men det finns även användning av metanogener. Biogas (metan) kan användas till bränsle och uppvärmning och det fås när fermenterande bakterier och metanogener bryter ned organiskt avfall anaerobt. En annan viktig eventuell nytta av metanogener är vid slutförvar av använt kärnbränsle. Metanogener och andra mikroorganismer skulle kunna bidra till en syrefattig miljö som kan förhindra korrosion av kopparbehållare med kärnavfall. Mikroorganismerna skulle kunna bidra till att förhindra spridning av långlivade radionuklider ut i grundvattnet.

Inledning

Domänen arkéer har många arter med intressanta egenskaper. En del har en energimetabolism som särskiljer dem, till exempel gruppen haloarkéer som har ett bakterierhodopsindriven ljusutnyttjande eller metanogenerna som producerar metan. Arkéer har ansetts vara enbart extremofiler och har hittats i habitat som heta källor och salta sjöar men numera har det blivit klart att de finns överallt i miljön. Metanogener är en grupp arkéer som är väldigt viktiga i ekosystemet. De finns överallt i naturen och deras metanproduktion har användningsområden som samhället kan ha nytta av. Men de bidrar även till växthuseffekten. Arkéer skiljer sig en del från bakterier och eukaryoter, men det finns även en del likheter. Min avsikt med uppsatsen är att ge en större förståelse för metanogenerna och hur de kan utnyttjas.

Arkéer

Arkéer visar likheter med bakterier och med eukaryoter men också skillnader. Arkéers tRNA (transfer-RNA), DNA-polymeras, -helikas och -ligas är mer lika eukaryoternas än bakteriernas, och i vissa avseenden har arkéer proteiner som inga andra organismer har (Bernander 1998). Nästan 15 % av de proteiner som kodas från arkéers genom är unika för dem (Graham *et al* 2000). Deras DNA-beroende RNA-polymeras har en unik struktur (Olsen och Woese 1997). Arkéers mRNA med Shine-Dalganosekvenser och gener samlade i operon liknar bakteriernas (Olsen och Woese 1997). De flesta arkéarter har cirkulära kromosomer (Bernander och Skarstad 2000). Trots att arkéers kromosomer liknar bakteriernas är deras kromosomreplikation mer lik eukaryoters. Transkriptionen och translationen är mer lik eukaryoters medan resten av metabolismen är mer lik bakteriernas. Initieringen av transkriptionen hos arkéer liknar en enkel form av eukaryoters transkription och har ingen likhet med bakteriernas (Olsen och Woese 1997).

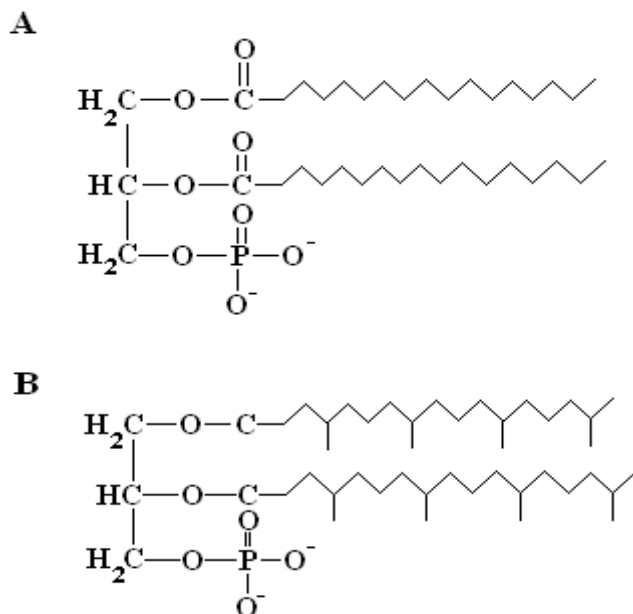


Bild 1. Översiktsbild över bakteriernas och arkéers cellmembran. A visar bakteriernas cellmembran med esterbindning och fettsyradkedjor. B visar arkéernas cellmembran med eterbindning och sidokedjor av isoprena kolväten med förgreningar.

Både arkéer och bakterier saknar kärnmembran (Bernander och Skarstad 2000). En skillnad mot bakterier är arkéers cellvägg och cellmembran. Arkéer har L-glycerol medan bakterier och eukaryoter har D-glycerol i sina cellmembran. Bakterier och eukaryoters membran har

esterbindningar men arkéers har eterbindningar istället, vilket gör att de saknar en syreatom i cellmembranet (bild 1). Arkéer använder inte fettsyra kedjor som sidokedjor i cellmembranet som bakterier och eukaryoter utan de har sidokedjor uppbyggda av isoprena kolväten. Detta gör att arkéernas sidokedjorna är förgrenade, dvs får en annan struktur än hos bakterier och eukaryoter (Madigan och Martinko 2006).

Bakteriers cellvägg består av murein som är uppbyggd av polysackaridkedjor som via kovalenta bindningar hålls ihop av peptidkedjor. Arkéers cellvägg består antingen av pseudomurein, heteropolysackarid eller av protein. Det finns även arkéer som saknar cellväggar. *Ferroplasma acidophilum*s cellmembran innehåller ovanliga kaldarkéetidylglyceroltetraeterlipider, som har väldigt låg protongenomtränglighet. Det är troligen en bidragande orsak till att de tål miljöer som är extremt sura. Det optimala pHt för att de ska växa är 1,7 (Golyshina 2005).

Det finns arkéer som har kvadratiska celler och är de dominerande mikroorganismerna i hypersalta miljöer. Cellerna ser ut som tunna, kvadratiska eller rektangulära blad med skarpa hörn och gasvesiklar längs med kanterna. Hos runda celler är turgortrycket lika i alla riktningar. Kvadratiska celler skulle inte klara av turgortrycket utan skulle gå sönder. Undersökningar talar för att de saknar turgortryck vilket gör att de behöver mindre komplexa cellväggar och kan anta en kvadratisk form. Eftersom de är kvadratiska har de en större yta för att ta upp näring. Den kvadratiska formen gör att de väldigt effektivt kan absorbera ljus om de är orienterade mot det inkommande ljuset. Gasvesiklar som finns hos växande kvadratiska celler ger en uppåtgående rörelse som energimässigt kostar mindre än att ha flageller som står för rörelse. Det kvadratiska utseendet och gasvesiklarna gör att de kan flyta uppåt mot ytan och fånga upp mer solljus (Walsby 2005).

Fylogeni

Carls Woese gav arkéer en egen domän i slutet av 1970-talet (Woese 1996). Numera indelas de i fyra undergrupper, Crenarchaeota, Euryarchaeota, Korarchaeota och Nanoarchaeota. De två största undergrupperna är Crenarchaeota och Euryarchaeota. Fenotypiskt är arkéer uppdelade i fyra metaboliska typer, metanogener, extrema halofiler, sulfotermofiler och en grupp termofila sulfatreducerande arter. Euryarchaeota omfattar en blandning av de fyra fenotypiska grupperna och Crenarchaeota omfattar sulfotermofiler och termofila sulfatreducerare. På senare år har det även isolerats icke-termofila Crenarchaeota (Woese 1996). Många euryarkéer och krenarkéer har inte har odlats men finns i stor utsträckning i havsvatten (Madigan och Martinko 2006).

Molekylära metoder används vanligen för att se släktskap hos prokaryoter. Den vanligaste fylogenetiska markören som används är SSU-rRNA (small subunit) som är RNA från ribosomens lilla enhet. rRNA finns hos alla organismer. Genom att jämföra SSU-rRNA-gensekvenser kan man få fram närmaste släktingar (Woese *m fl* 1990). Det har även gjorts fylogenetiska träd med ribosomala proteiner, men de är väldigt lika de fylogenetiska träden som är gjorda med SSU-rRNA (bild 2). Arkéerna skiljer sig fylogenetiskt sett väldigt mycket från de andra domänerna när träden är baserade på SSU-rRNA och proteinsekvenser (Matte-Tailliez *m fl* 2002).

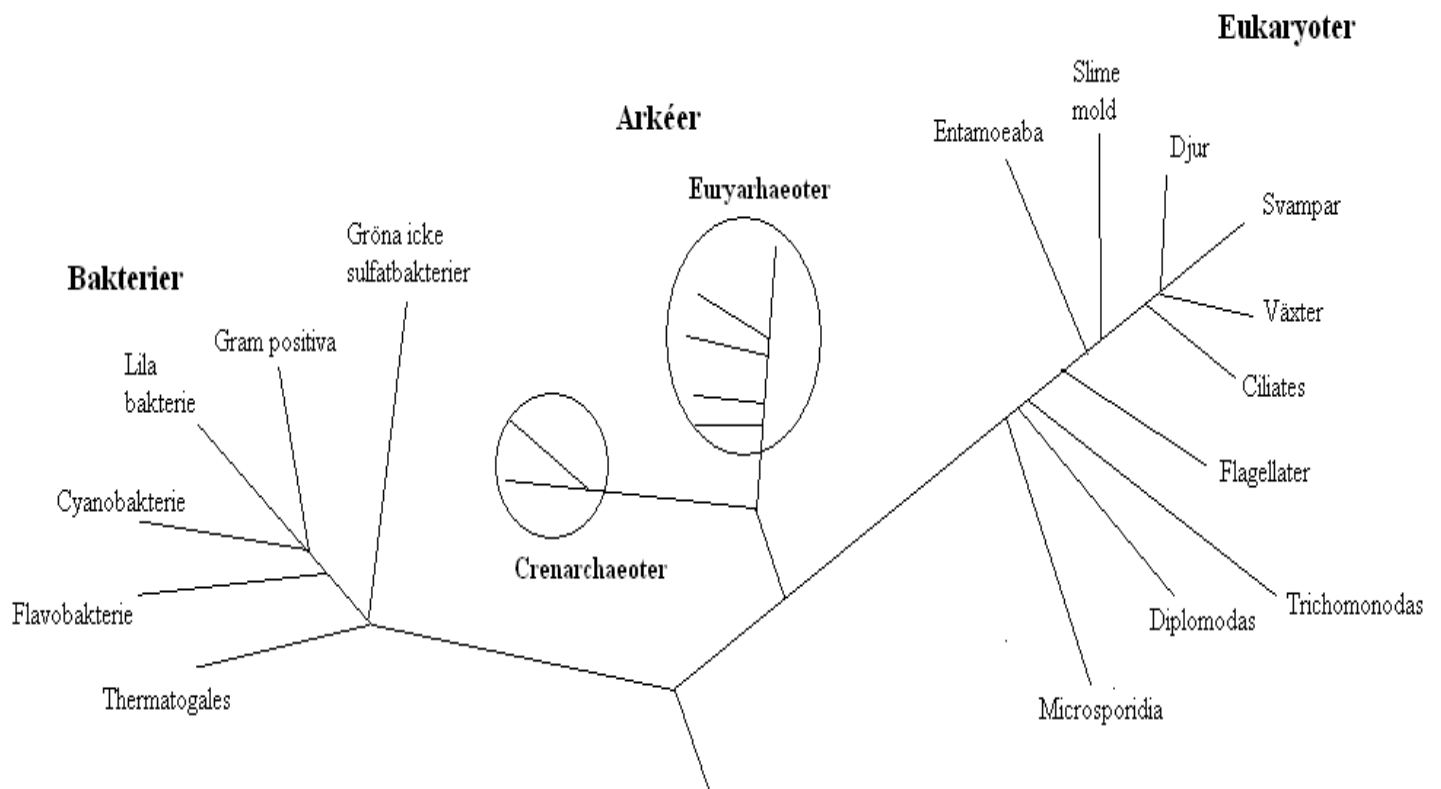


Bild 2. Fylogenetiskt träd över de tre domänerna baserat på rRNA-sekvenser. Bara de två största undergrupperna inom arkéerna är utplacerade (efter Woese 1996).

Gao och Gupta (2007) använde sig av 31 proteiner, för att få fram ett fylogenetiskt träd för arkéerna (bild 3), varav vissa finns hos alla arkéer och vissa är specifika för några få grupper hos arkéerna. Proteinerna som användes finns inte hos bakterier eller eukaryoter. Ett av proteinerna har bara påträffats hos Euryarchaeota och Nanoarchaeota vilket tyder att de har ett närmare släktskap med varandra än med andra grupper som inte har det proteinet. Även andra proteiner stämde överens mellan grupperna Euryarchaeota och Nanoarchaeota men de proteinerna fanns även hos andra arkéer. Nanoarchaeota är väldigt svåra att placera in eftersom de är relativt nyupptäckta och placeringen varierar beroende på vilken analysmetod som används. Det faktum att det bara har påträffats en organism, *Nanoarchaeum equitans*, gör det ännu svårare att placera in dem i fylogenetiska träd (Hohn *m fl* 2002). Det har inte isolerats någon organism av Korarchaeoterna, bara SSU-rRNA-gener vilket gör att även de är svåra att placera in. De lever i varma källor och extrema miljöer med temperaturer från 50°C till 128°C vilket innebär svårigheter med att odla dem på laboratorium (Auchtung *m fl* 2006).

Metanogenerna utgör den största gruppen hos euryarkéerna (bild 3). De finns i fem specifika klasser, Metanobacteriales, Metanococcales, Metanopyrales, Metanomicrobiales och Metanosarcinales. Eftersom metanogenerna är blandade med andra fenotypiska grupper som haloarkéer och Archaeoglobus i det fylogenetiska trädet har det föreslagits att den gemensamma anfadern till Euryarchaeota var en metanogen, men att de gener som krävs för metanogenesen har försvunnit från de andra grupperna (Gao och Gupta 2006).

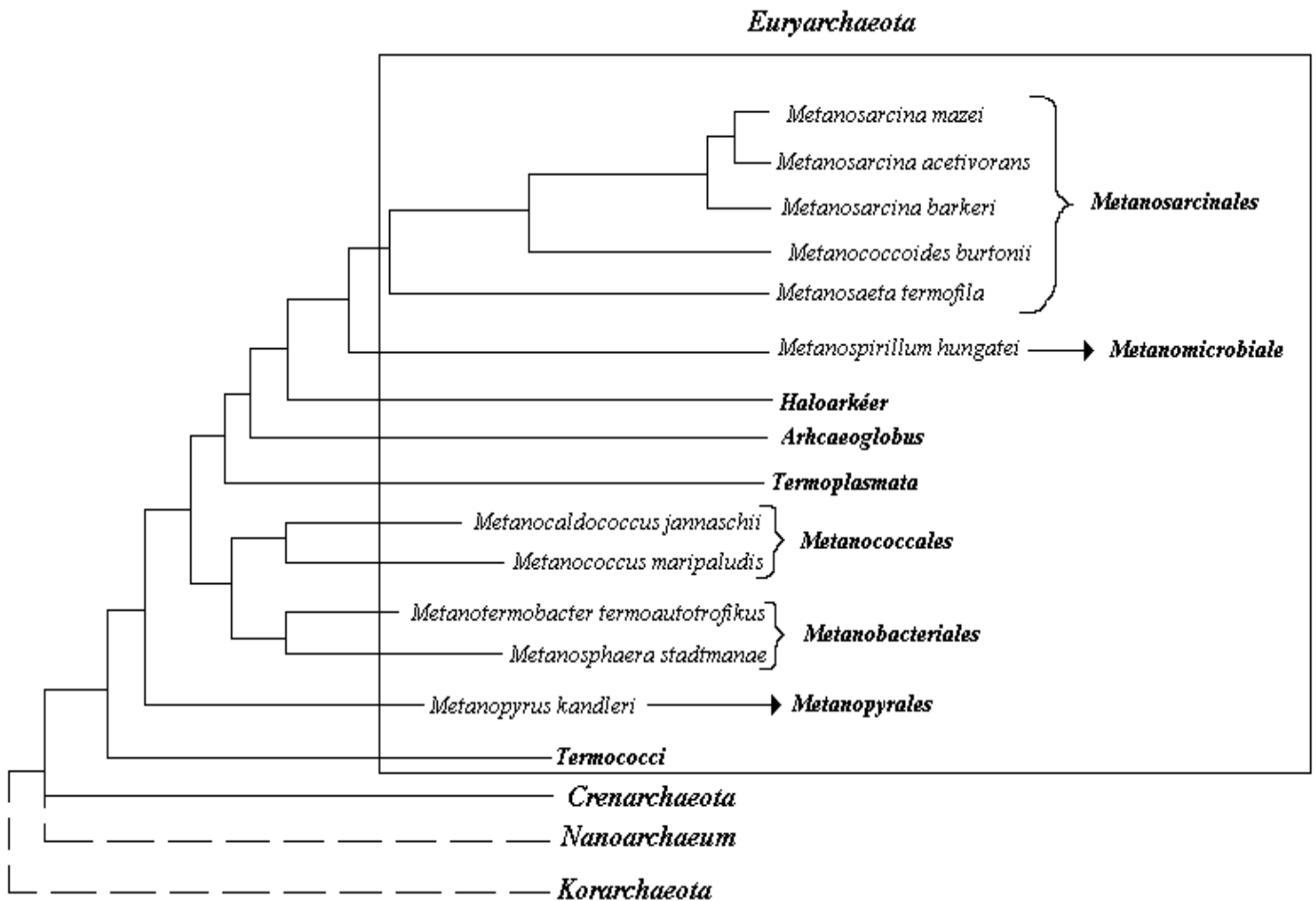


Bild 3. Fylogenetiskt träd för arkéerna baserat på sekvenser av 31 proteiner med grannklustring (efter Hohn *m fl* 2002). Trädet är särskilt detaljerat för Euryarchaeota med de olika klasserna och fyla i fetstil. De arter som står med är de arter som användes i studien som Hohn *m fl* utförde. Korarchaeota och Nanoarchaeota har streckade linjer eftersom deras placering är väldigt osäker.

Metanogener

Metanogener har en unik metabolism där slutprodukten är metan. De är viktiga för kolets globala kretsloppet. Metanogenerna återför kol till atmosfären i form av metan. Metan är en viktig växthusgas som bidrar till klimatförändringar och global uppvärmning. Därför är det viktigt att förstå metanogenerna.

Till skillnad från många andra arkéer så finns många av metanogenerna i miljöer med medelmåttig temperatur, pH och salthalt. En annan egenskap som skiljer metanogenerna från andra arkéer är att de har koenzym som är specialiserade för metanproduktion som till exempel koenzym F₄₂₀ och koenzym M. Metanogener är väldigt svåra att hantera och odla eftersom de är anaeroba och det är svårt att artificiellt efterlikna deras naturliga miljöer. Det är troligen bara en liten del av alla metanogener som har blivit identifierade (Madigan och Martinko 2006).

Morfologi

Metanogeners cellväggar är uppbyggda av pseudomurein, protein eller heteropolysackarid. Pseudomurein liknar bakteriernas murein och består av L-talosaminuronsyra istället för mureinsyra, $\beta(1-3)$ bindning istället för $\beta(1-4)$ bindning i polysackaridstrukturen och olika

sekvenser av korsbundna aminosyror. Proteincellväggar består av ett kristallint arrangemang av proteiner eller glykoproteiner kallat S-lager. S-lager ger bara ett begränsat skydd, till skillnad från pseudomureinet, vilket gör arkéerna känsliga för osmotiska skillnader. Heteropolysackaridcellväggar är uppbyggda av en polysackaridmatris som liknar en struktur i eukaryoters stödjevävnad. Metanogens cellmembran har flera ovanliga lipider. Till största del är de polära och antingen difytanol-diglycerol-dietrar eller dibifytanyl-diglycerol-tetraetrar (Whitman *m fl* 2006).

De olika familjerna hos metanogenerna skiljer sig vad gäller morfologi, Methanobacteriaceae och Methanothermaceae är nära släkt med varandra och båda har cellväggar delvis bestående av pseudomurein. Methanothermaceae har även ett ytlager av protein vilket Methanobacteriaceae inte har. Methanobacterium har filament och kan bilda flercelliga aggregat. Andra familjer som Methanococcaceae har cellväggar uppbyggda av undertyper av proteiner i ett S-lager. Alla Methanococcaceae är oregelbundna kocker, de är rörliga med en eller två flageller. Metanogener kan färgas gram-negativa eller gram-positiva men eftersom de har en annorlunda cellvägg jämfört med bakterier fungerar inte gramfärgning som karaktärsdrag (Whitman *m fl* 2006).

Habitat

Vanliga habitat för metanogener är anaeroba röt-kammare, syrefattiga sediment, översvämmade jordar, biogasreaktorer, oljefält, våtmarker, sumpmarker, mossor, kärr, ökenjordar, risfält och mag- och tarmkanaler hos växtätande djur. De finns överallt där det finns organiskt material i anaerob miljö (Kotelnikova 2002). I mänsklig avföring har *Methanobrevibacter smithii* och *Methanosphaera stadtmaniae* isolerats. De har även påträffats i grundvatten och kloakvattenslam. Methanothermaceae lever i geotermiskt vatten och gytta vid temperaturer kring 80-90°C (Yanagita *m fl* 2000).

Ju längre ner i sedimenten man kommer desto fler metanogener finns det. Några av de metanogener som finns i sedimenten i sjöar är Methanomicrobiales och Methanosaetaceae. Det finns metanogener även i de övre sedimentlagren men de verkar vara i ett vilostadium. De producerar just ingen metan (Conrad *m fl* 2007). I mesotrofa (måttligt näringsrika) och oligotrofa (näringsfattiga) sjöar förekommer metanogener endast i de djupare sedimenten eftersom dessa sjöar är syrerika året runt vilket hämmar metanogener. I eutrofa (näringsrika) sjöar är metanogener de dominerande mikroorganismerna i sedimenten (Lovely och Klug 1983).

Även i berggrunden finns metanogener. Miljön där är anaerob och grundvattnet som finns i hålrum och skrevor i berggrunden sträcker sig från sötvatten till väldigt salt. Koncentrationen av H₂ är högre i vatten djupt under marken än i andra vattensystem. För att metanogener ska trivas under jorden behöver sulfatnivån vara låg och temperaturen ligga mellan 9°C och 110°C. Den övre temperaturen verkar vara den begränsande för hur djupt de kan leva (Kotelnikova 2002).

Det finns metanogener som lever i symbios med ciliater, marina plankton och amöbor som endo- eller ektosymbionter. Metanogener lever även i syntrofi (samarbete för att kunna bryta ned ett substrat) med encelliga eukaryoter, svampar och vissa bakterier i våmmen hos idisslare. SSU-rRNA från metanogener i symbios skiljer sig från de frilevande metanogenerna. Än så länge så är det bara Methanococcales och gruppen Methanosarcina som inte har blivit isolerade som symbionter (Embley och Finlay 1993).

Metabolism

Metanogener använder olika substrat som energikälla för att producera metan beroende på vilket habitat de har och vilken energikälla som finns tillgänglig. Metanogener är strikt obligata metanproducenter, dvs de kan bara växa när förhållandena är rätt för att metan ska kunna produceras. De vanligaste energikällorna är vätgas, format och acetat. Även andra energikällor som metanol, trimetylamin, dimetylsulfid och några alkoholer som isopropanol, isobutanol, cyclopentanol och etanol används av vissa metanogener (Kotelnikova 2002).

Vätgas, enkla alkoholer och en-kolföreningar som energikälla

Metanogener är ofta beroende av fermenterande bakterier som omvandlar organiska föreningar till substrat som metanogener kan använda (bild 4). De fermenterande bakterierna oxiderar organiskt material till organiska syror, alkoholer och vätgas samt koldioxid som metanogenerna använder till att producera metan (Whitman *m fl* 2006).

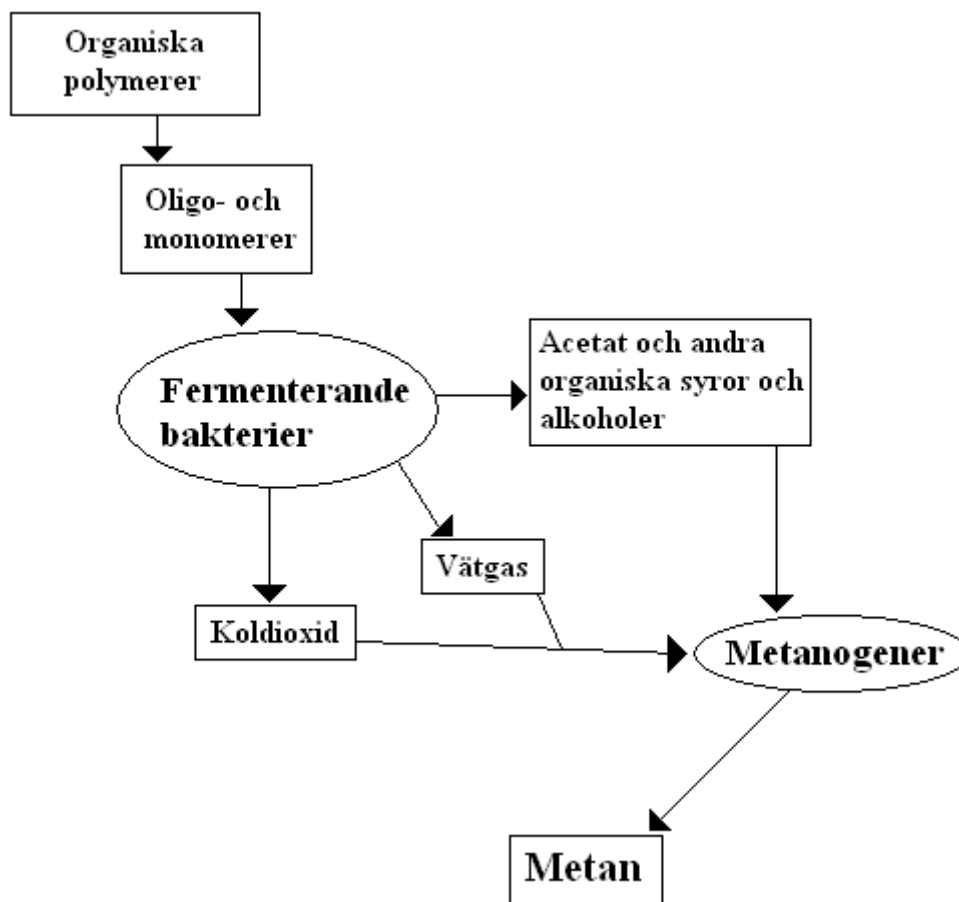


Bild 4. Nedbrytningen av organiskt kol till metan med hjälp av fermenterande bakterier. Kvadratiske boxar är kemiska ämnen och ovala boxar är organismer (efter Pedersen 1999).

Metanogenerna i sin tur håller koncentrationerna av H_2 och format nere, när de blir för höga inhiberas de fermenterande bakterierna (Whitman *m fl* 2006).

Metanogener använder inte bara H_2 från multnande organiskt material utan även geotermiskt (från berggrunden) H_2 som energikälla. Metanogenerna behöver då inte vara beroende av andra organismer. Dessa metanogener lever i heta källor och har isolerats bland annat på Island (Kotelnikova 2002).

De metanogener som oxiderar H₂, format eller vissa alkoholer reducerar även CO₂ (bild 5). De flesta metanogener kan använda H₂ som elektrongivare. Det är mindre vanligt att de använder alkoholer. I många habitat som i våmmen hos idisslande djur är CO₂-reduktion den största källan till metan (Whitman *m fl* 2006).

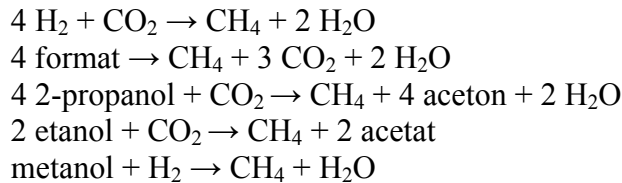


Bild 5. Översikt över reaktioner där H₂ och enkla alkoholer används som energikälla.

Det finns metanogener som använder sig av olika metylinnehållande en-kolföreningar som energikälla. Några av energikällorna oxideras till CO₂ och då reduceras den kvarvarande metylgruppen till metan (bild 6). De energikällorna är vanliga i miljöer som i marina sediment och tjocktarmen hos däggdjur (Whitman *m fl* 2006).

De grupper som använder sig av acetat som största källa till metanproduktion är väldigt få. *Methanosarcina* och *Methanosaeta* som finns i många miljöer reducerar kolet i metylgruppen i acetat till metan medan karboxylkolet oxideras till CO₂ (bild 6). Användningen av acetat är vanlig i syrefattiga sötvattensediment där andra anaerobers metabolism av acetat är begränsad. Trimetylamin används vanligen av metanogener i hypersalta miljöer som energikälla (Whitman *m fl* 2006).

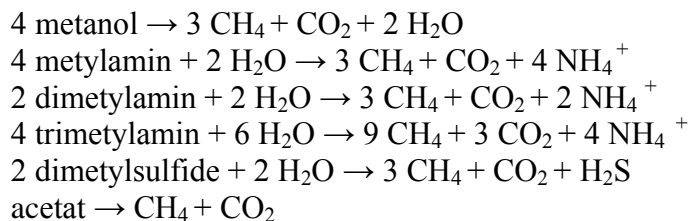


Bild 6. Översikt över reaktioner där en-kolföreningar används som energikälla.

Sulfatreducerande bakterier tävlar ut metanogener

I habitat där det finns elektronmottagare som SO₄²⁻, O₂, NO₃⁻ och Fe³⁺ är metanogener begränsade. De flesta sulfatreducerande bakterierna finns i de övre lagren av sedimenten och de aktiva metanogenerna i de djupare sedimenten i sjöar (Conrad *m fl* 2007). Den hämmande effekten kommer från att de konkurrerar ut metanogenerna när sulfat finns tillgängligt eftersom deras oxiderande enzym har högre affinitet för huvudenergiällorna acetat och H₂ som båda använder. Metanogener använder då istället energikällor som trimetylamin som sulfatreducerande bakterier inte kan använda (Purdy *m fl* 2003).

Produktion av metan

Metanogener producerar metan via CO₂-reduktion eller genom att reducera eller oxidera metylgrupper i olika föreningar till metan. Oavsett vilket ämne som används som energikälla krävs att metylkoenzym M demetyleras av metyl-CoM reduktas med elektroner från koenzym B (bild 7 steg 5 och 6). Då erhålls med hjälp av kofaktor F₄₃₀ metan och en disulfid av CoM och CoB (Schäfer *m fl* 1999). De viktiga koenzym som är involverade i metanogenesen är metanofuran, metanopterin, koenzym M, koenzym F₄₃₀, koenzym F₄₂₀ och

koenzym B. De första fyra koenzymerna används som kolbärare från energikällan som används. De två sistnämnda koenzymerna fungerar som elektrongivare i redoxreaktionerna för att kunna reducera CO₂ till metan (Madigan och Martinko 2006).

När metan bildas från H₂+CO₂ aktiveras CO₂ och binder till metanofuranet (MF). Sedan reduceras CO₂ och metanofuranet till formyl-metanofuran av formylmetanofurandehydrogenaset (Blaut 1994). Den första stabila produkten i metanogenesisen är formyl-metanofuran (bild 7 steg 1). Formylgruppen flyttas från metanofuranet till ett enzym som innehåller metanopterin (MP) i steg två (Madigan och Martinko 2006).

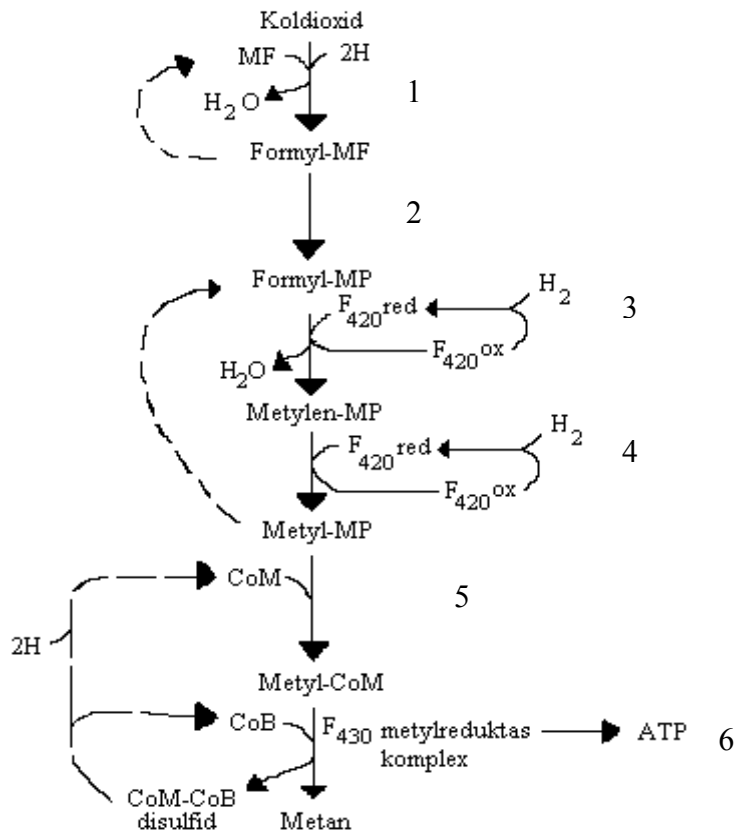


Bild 7. Översikt över metanogenesisen där H₂ + CO₂ används som energikälla. MF; metanofuran, MP; metanopterin, CoM; coenzym M och CoB; coenzym B (efter Madigan och Martinko 2006).

I de följande stegen tre och fyra reduceras formylgruppen till metylen och metyl av koenzymet F₄₂₀ (Blaut 1994). Metylgruppen överförs från metanopterin till koenzym M i steg 5. I steg sex reduceras metyl-CoM till metan av metylreduktassystemet där koenzym F₄₃₀ och koenzym B är viktiga. Koenzym F₄₃₀ tar bort metylgruppen. Koenzym B reducerar komplexet av metyl och koenzym F₄₃₀ och bildar en disulfid med koenzym M (Madigan och Martinko 2006). Slutligen reduceras disulfiden till fria koenzym M och B. Det sista steget är det viktigaste i bevarandet av energin. Disulfidreduktaset är membranbundet (bild 8) och sista steget i elektrontransportkedjan (Schäfer *m fl* 1999).

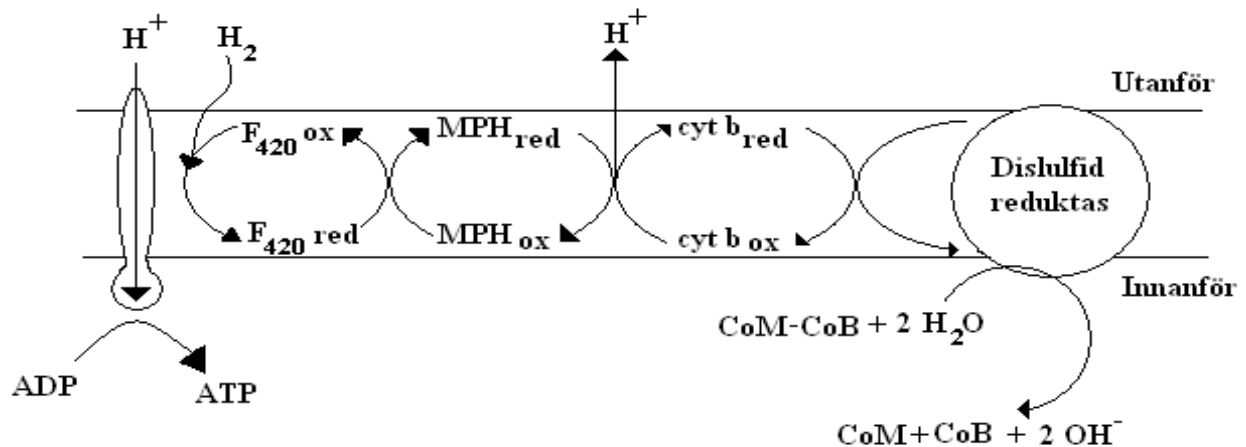


Bild 8. Översikt över elektrontransportkedjan där vätgas samt koldioxid används som energikälla (efter Madigan och Martinko 2006). Cyt b är cytokrom b och MPH är metanofenazin.

Metanofenazin (MPH) är en elektronbärare som är integrerad i membranet (Madigan och Martinko 2006). De redoxreaktioner som katalyseras av den membranbundna elektrontransportkedjan är sammankopplade med protonförflyttning (bild 8) genom det cytoplasmatiska membranet (Schäfer *m fl* 1999). Elektroner från vätgas reducerar F_{420} och sedan metanofenazin. Metanofenazin reducerar disulfidreduktaset genom cytokrom b med utdrivning av protoner till utsidan av membranet (Madigan och Martinko 2006). Det resulterar i en elektrokemisk protongradient som är den drivande kraften för ATP syntes. Olika substrat behöver särskilda elektrongivare, CO_2 behöver H_2 och hydrogenas och när metylgrupper används som substrat behövs metyltransferas. Metyltransferas är en reversibel natriumjonpump som kopplar samman transporten av metylgrupper med transporten av Na^+ genom membranet. Det sker när vätgas inte är närvarande (Schäfer *m fl* 1999).

Utnyttjandet av metanogener och metan

Uppskattningsvis 20% av världens naturliga gasresurser produceras av mikroorganismer. Produktionen av metan ökar hela tiden eftersom det finns mer nötboskap och fler risodlingar där metanogener trivs (Kotelnikova 2002).

Kärnkraftverk

Ett problem för många länder är hur avfall från kärnkraftverk ska lagras på ett säkert sätt. Mikroorganismer koloniserar radioaktivt kontaminerade miljöer; det har även påträffats fastsittande på väggar i en bassäng som lagrar nukleära material vid ett kärnkraftverk i Spanien. Andra miljöer som har studerats är magasinet Severnyi i Ryssland för radioaktiva avfall där metanogener har odlats fram från prover tagna 162-405 m under havsytan (Lloyd *m fl* 2005).

Radioaktivt avfall i Sverige kommer till största delen ifrån kärnkraftverk men även från forskning, sjukhus och industrier. Idag förvaras det radioaktiva avfallet lite olika beroende på om det är lågaktivt, medelaktivt eller högaktivt. Högaktivt avfall är använt kärnbränsle från kärnkraftverken. Det radioaktiva avfallet placeras i vattenbassänger för att kylas ner och för att skydda omgivningen mot strålning. Där förvaras avfallet i ungefär 30-40 år för att sedan kunna förflyttas till slutförvaring (Statens strålskyddsinstitut 2007).

Det pågår forskning om hur slutförvaringen av radioaktivt avfall ska fungera. I Sverige finns ett forskningsprogram som undersöker hur mikroorganismer i underjorden skulle

påverka förvaringen av radioaktivt avfall. Radioaktiviteten minskar med tiden, men det finns några långlivade radionuklider som är farliga länge. Avfallet planeras att förvaras i magasin ungefär 500 m under jorden i kopparbehållare med det radioaktiva avfallet som omsluts av bentonitlera som har en stor vattenupptagande förmåga för att leda bort grundvatten. Metaboliskt aktiva *Methanobacterium subterraneum* har påträffats ner till 450 m under Äspö laboratorium. Metanogenernas produktion av metan gör att bakterier som oxiderar metan med syre skulle hjälpa till att få magasinet syrefritt, vilket i sin tur skulle reducera risken för korrosion av kopparbehållarna med det radioaktiva avfallet. Om det skulle finnas syre kvar från grundvattnet i bentonitleran skulle det kunna få förödande effekter genom att flera långlivade radionuklider skulle komma ut i grundvattnet. Genom oorganiska reaktioner skulle det ta ungefär 300 år för syret att försvinna men med hjälp av mikroorganismer skulle det inte ta mer än några månader eller år. Om metanogener och andra mikroorganismer skulle inkorporera långlivade radionukleider skulle det kunna öka radionukleidernas rörlighet. Om mikroorganismerna däremot sitter i en biofilm skulle de kunna fånga upp radionukliderna och förhindra spridning (Pedersen 1999). En biofilm är när mikroorganismer bildar ett tjockt lager av celler som gör att mikroorganismerna kan fästa vid en yta (Madigan och Martinko 2006). Forskning pågår kontinuerligt för att se om metanogener och andra mikroorganismer har någon inverkan på slutförvar och hur de kan utnyttjas på bästa sätt (Pedersen 1999).

Biogas

Biogas (metan) produceras genom att exempelvis organiskt avfall eller avloppsvatten bryts ned av fermenterande bakterier och metanogener som producerar metan (Narihiro och Sekiguchi 2007). Avfall från skogsbruk, jordbruk, industrier och kommuner orsakar nedskräpning av land, vatten och luft. Okontrollerade utsläpp av gaser i atmosfären från organiska avfall som bryts ned av mikroorganismer bidrar till växthuseffekten. Den gasen kommer bland annat från våra hushållssopor och från reningsverk (Viéitez och Ghosh 1998). I Sverige används 10% av hushållsavfallet och trädgårdsavfallet till att producera biogas. Det sker i anaeroba rötningskammare. Resterna efter rötningen används som snabbverkande gödsel (biogödsel) inom jordbruket (Avfall Sverige 2007). Det går även att använda slaktavfall för att producera biogas. Innan avfallet går till röt-kammaren blandas det först i en blandningstank till ett substrat (bild 9), och därefter pastöriseras det vid 70°C i en timme för att få bort eventuella smittoämnen (Kalmar Vatten 2007). I Uppsala kommun produceras ca 25 000 ton biogödsel på ett år; den mängden kan försörja 100 hektar åkermark med näring (Uppsala Kommun 2008).

Biogas kan framställas, till exempel genom rötning av organiska sopor, från gödsel eller från avloppsvatten. Oavsett vad som används som utgångsmaterial så är det samma förlopp. En blandning av mikroorganismer bryter ner organiska föreningar till slutprodukter som metan och koldioxid, det vill säga biogas. Miljön för att mikroorganismer ska kunna producera biogas måste vara anaerob. Det organiska materialet bryts ned i tre steg, hydrolys, acetogenes och metanogenes. Hydrolysen innebär att organiska makromolekyler som kolhydrater, proteiner och fetter bryts ner till monomerer. Monomererna i sin tur fermenteras till organiska syror och alkoholer samt vätgas och koldioxid. Ättiksyra kan även produceras av vissa bakterier som kallas acetogener från koldioxid, vätgas, och från långa fettsyror, alkoholer och kolhydrater. Ättiksyran liksom vätgas och andra enkla kolföreningar oxideras sedan av metanogenerna till metan (Lastella *m fl* 2002). Det måste finnas en balans mellan dessa reaktioner, annars stoppas metanproduktionen. Ammoniak och flyktiga fettsyror kan inhibera metanogenesen och hydrolysen (Vedrenne *m fl* 2007). Genom att utnyttja mikroorganismer i avfallshandling går det att få slutprodukter som istället för att släppas ut i

atmosfären kan användas till uppvärmning eller bränsle (Narihiro och Sekiguchi 2007). Det som blir kvar efter rötningen används som biogödsel (bild 9). Biogödsel är ett bra alternativ till vanligt gödsel eftersom växterna lättare kan ta upp kväve och fosfor från biogödsel än från konstgödsel men problemet är att det kan finnas tungmetaller kvar (Kalmar Vatten 2007). Om det finns tungmetaller i biogödsel beror på vad för avfall som används. Biogödsel från Kalmar Biogas AB innehåller godkända nivåer av tungmetaller. Idag används biogödsel i många kommuner och det finns bestämmelser och krav gällande vad för avfall som får användas för att få biogödsel. De avfall som används till biogödsel i Kalmar är nötgödsel, slakteriavfall och fett från restauranger och storkök (Kalmar Biogas AB 2008).

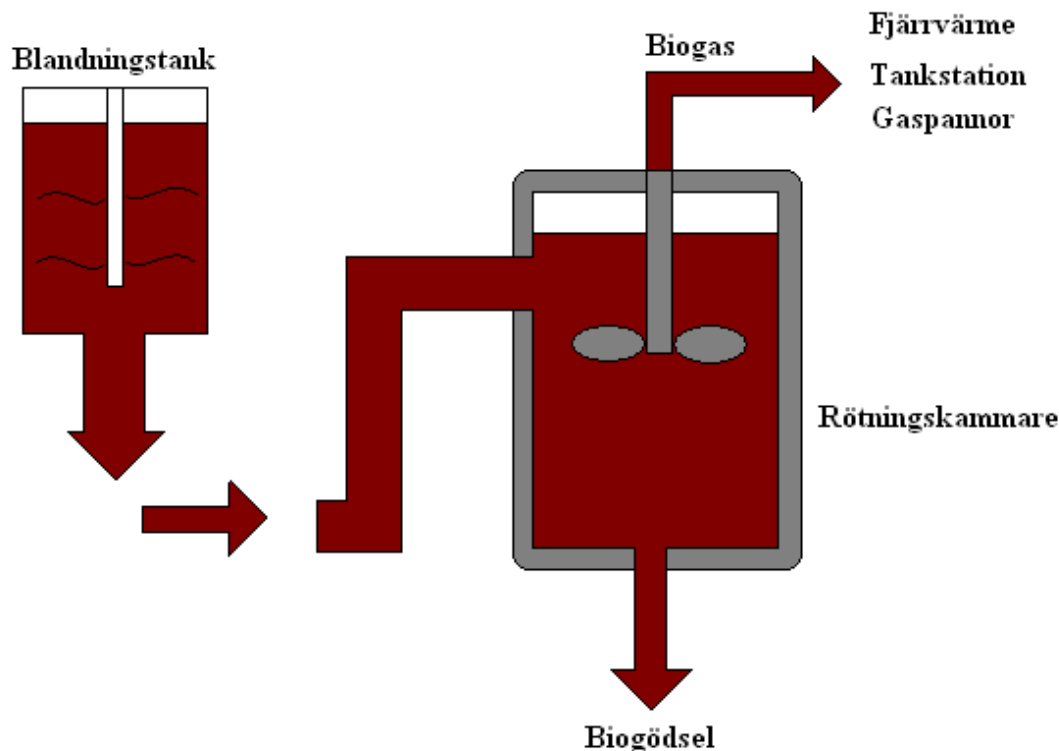


Bild 9. Översikt över rötningsskammare och förloppet att få fram biogas och slutprodukterna. I blandningstanken blandas det som ska brytas ned, till exempel hushållsavfall och slaktavfall. Gasen går bland annat till fjärrvärme, tankstationer och gaspannor (efter Kalmar Vatten 2007).

Biogas som energikälla är ett ekonomiskt bättre alternativ än etanol, som kräver grödor och mycket vatten för att produceras. Biogas kommer från våra egna sopor som ändå måste tas om hand. Med så många människor i världen som svälter och med växande sopberg borde biogas vara ett bättre alternativ än etanol. Det är dock bara organiskt avfall som kan brytas ned till metan av metanogenerna vilket gör att soporna måste källsorteras. Det finns vissa miljöproblem som kan uppstå från rötningen till metan. Metan och lustgas kan läcka ut och påverka atmosfären, även ammoniak kan smita ut och orsaka övergödning och försurning (Naturvårdsverket 2008).

Jordbruk

Under de senaste 300 åren har metanhalten ökat 2,5 gånger, till stor del på grund av jordbruk, nedbrytning av avfall och brytning av fossila bränslen (Lassey 2007a). De största källorna till metanutsläpp från jordbruk är idisslande djur (nötboskap, får m fl), gödsel från djuren och risfält. De orsakerna är hårt sammankopplade till varandra eftersom gödsel används till risfält och mängden gödsel som produceras beror på hur många djur som hålls. Från risfälten

kommer metanproduktionen inte bara från gödsel utan från att plantorna sätts under vatten vilket skapar anaeroba miljöer för metanogenerna (Verburg och Denier van der Gon 2001). Jordbrukssektorn står för ungefär 22% av det totala utsläppet av växthusgaser. Boskapshållning och transporten av djur och mat ger ungefär 80% av jordbrukssektorns utsläpp (McMichael *m fl* 2007). En mjölkko släpper ut ungefär 300 g metan dag⁻¹. Samma mjölkkos utsläpp på en dag skulle ge den mängd metan som krävs för att köra en biogasbil ungefär 5 km dag⁻¹ (Lasey 2007a). Hos idisslare finns metanogenerna till största del i våmmen, som är den största av förmagarna (Yanagita *m fl* 2000). Ungefär 90% av den metan som produceras i våmmen frisläpps genom uppstötningar (Lasey *m fl* 1997b).

I vissa delar av Australien är fårskötseln en viktig del av näringslivet. Får är också idisslare och bidrar på samma sätt som nötboskap (Denman *m fl* 2007) till metanproduktionen. *Methanobrevibacter ruminantium*, *Methanomicrobium mobile* och *Methanosarcina* sp är troligen de metanogenerna som finns till störst mängd i våmmens mikrobiella ekosystem hos får. Hos får utgör metanogenerna ungefär 3,6 % av det totala antalet mikroorganismer i våmmen och cirka 54% av dem är *M. mobile* (Yanagita *m fl* 2000). *Methanosphaera* som isolerats från tjocktarmen använder H₂ för att reducera metanol till metan. Det finns även metanogener som reducerar CO₂ i våmmen (Yanagita *m fl* 2000). Det mikrobiella ekosystemet i våmmen ser annorlunda ut hos lamm än hos vuxna får. Deras våm är inte riktigt utvecklad när de är små och när den börjar växa ändras sammansättningen av det mikrobiella ekosystemet. Undersökningar visar att redan en dag efter födseln så har lamm metanogener i våmmen. Utom de metanogener som redan nämnts finns *Methanobacterium formicium* och *Methanoculleus olentangyi* närvarande i våmmen. Eftersom metanogener etablerar sig i våmmen redan hos nyfödda när de diar så verkar inte dieten spela så stor roll för om metanogener kommer att finnas i våmmen hos nyfödda lamm eller inte (Skillman *m fl* 2004).

Dieten spelar däremot en roll för hur mycket metan som kommer att produceras från djurens gödsel (Amon *m fl* 2006). Undersökningar bedrivs för att se om olika dieter skulle få metanogenerna att minska i våmmen hos oxar. Bromklormetan är ett ämne som i vissa studier används som antimetanogent. Med det ämnet som tillskott till dieten går det att få en reduktion med 30% av metanproduktionen. Efter 12 timmar blev det en minskning av metanproduktionen med totalt 29% hos oxarna. Populationen av metanogener i våmmen minskade med 67,5% när oxarna fick bromklormetan med maten. I kontrollgruppen fanns det ingen signifikant skillnad i populationen av metanogener (Denman *m fl* 2007). Ett annat sätt att minska produktionen av metan i våmmen är att istället för bromklormetan använda jäst eller växtextrakt med koncentrerade tanniner som tillskott till dieten. Effekten varierar beroende på vilken diet djuren har, om det är hö, alfalfa eller någonting annat (Newbold och Rode 2006). Gödsel från boskap förvaras i fast form eller i vätskeform innan det ska tas omhand. Om det är anaerob miljö kommer metan att produceras och släppas ut i atmosfären. Gödsel från djuren används sedan som gödningsmedel (Park *m fl* 2006).

Diskussion

Biogas (metan) fås genom att bland annat organiskt avfall bryts ned av metanogener och andra mikroorganismer. Biogas går att använda till uppvärmning och som bränsle till bilar som drivs med biogas (Naturvårdsverket 2008). Biogas är ett miljövänligare alternativ till bensin och ett ekonomiskt bättre alternativ än etanol. Men trots det så säljs det väldigt få bilar som drivs med biogas. En anledning till det kan vara att det finns få ställen att tanka på. Bensinmackarna satsar hellre på etanol eftersom då går det att använda samma pumpsystem som för bensin, men med biogas måste nya pumpar byggas vilket kostar mycket pengar. Det finns inte särskilt många nackdelar med att producera biogas. Det skulle kunna läcka ut metan och lustgas i atmosfären från rötningen till metan. Men med tanke på hur mycket som läcker ut i atmosfären nu för att vi inte utnyttjar biogasen från jordbruk och avfall så skulle nog nettoeffekten av metan som läcker ut i atmosfären bli mindre. Även ammoniak skulle kunna läcka ut i naturen och orsaka övergödning och försurning. Fast jämfört med alternativen som etanol eller bensin till bilarna så är biogas ett bättre alternativ. Biogas kan produceras lokalt vilket minskar transportsträckorna som annars fås med bensin och etanol. Det går åt mycket grödor, vatten och fossila bränslen för att producera etanol vilket gör att det inte är ett miljövänligt alternativ att köra på etanol. I och med att länder som Kina och Indien kommer ikapp så kommer det att köras fler bilar och avgaserna kommer att öka drastiskt, vilket gör att det är ännu viktigare att det finns ett hållbart miljövänligt bränsle. En positiv biprodukt fås under rötningsprocessen, biogödsel. Biogödsel är ett bättre alternativ än konstgödsel eftersom växterna lättare kan ta upp näringsämnen. Det är noga kontrollerat vilka avfall som får användas till biogödsel för att det inte ska komma ut tungmetaller i miljön. Det finns endast några få nackdelar med biogas till skillnad från de andra alternativa bränslena som finns.

Jordbrukssektorn är en av de delar där metan kommer ut mest i atmosfären. Ju mer människor det finns på jorden desto mer mat krävs. Och ju mer mat som krävs desto mer odlar vi och desto fler djur har vi. Idisslande djur släpper inte bara ut metan via uppstötningar och genom att släppa väder utan även genom sin gödsel, som förvaras i behållare för att sedan användas som gödningsmedel. Men även andra djur har metanogener i mag- och tarmsystemen, dvs alla växtätande djur, för att inte tala om alla metanogener som finns ute i naturen i sumpmarker och våtmarker. Överallt där det sker nedbrytning av växtmaterial genom mikroorganismer finns metanogenerna. Gödsel används som gödning bland annat på risfält som i sig släpper ut mycket metan eftersom plantorna sätts under vatten vilket ger en anaerob miljö. Undersökningar bedrivs om det går att minska metanproduktionen i våmmen hos idisslande djur med hjälp av tillsatser i djurens diet. För att få bort metanogenerna helt från våmmen skulle det få lov att vara en helt steril miljö vilket inte är möjligt. Det är möjligt att det bara kommer att resultera i att metanogenerna dyker upp någon annanstans i miljön. Normalt sett så hålls balansen bland annat med att metanoxiderande bakterier minskar utsläppet av metan men när det finns så mycket mer boskap och risfält så fungerar inte det längre. Det leder till att mindre metan tas från atmosfären tillbaka till jorden igen. Med hjälp av gödsel från djuren kan vi få biogas som vi kan använda som bränsle till djurtransporter vilket skulle minska utsläppen av metan och koldioxid.

Att påstå att det skulle vara bättre att sluta med boskapshållning för miljön är att bedra sig själv lite grann. Visst skulle vi inte ha utsläppet från korna och andra idisslande djur men oavsett om korna äter gräset eller inte så sker det nedbrytning när gräset dör, och det sker bland annat med hjälp av metanogenerna. Även att sluta odla risfält skulle leda till samma sak. Det är endast en begränsad area av jorden som är brukad, på resten av arean så finns metanogener också. Det har blivit lite så att korna och andra idisslande djur har blivit

utpekade som de skyldiga när det egentligen är naturliga processer. Vad skulle människor i områden där det inte går att odla grödor leva på om inte djurhållning, de skulle få lov att importera mer än vad som krävs i dagsläget vilket skulle öka utsläppen via långa transportsträckor. Istället för att angripa de stackars idisslande djuren så får vi komma på möjligheter att utnyttja metanet på bästa sätt genom biogas och gödsel. Om det kommer att gå att använda metanogener i slutförvar för radioaktivt kärnbränsle är svårt att säga i nuläget, det krävs mer forskning.

Tack

Ett stort tack till Karin Carlson för intressant och bra handledning, till Jan Andersson för hjälp med fylogenetiska trädet och till seminariegruppen för bra feed-back.

Referenser

- Amon T, Amon B, Kryvoruchko V, Zollitsch W, Mayer K, Gruber L, (2006). Biogas production from maize and dairy cattle manure-Influence of biomass composition on the methane yield. *Agriculture, Ecosystem and Environment* **118**: 173-182
- Auchtung T A, Takacs-Vesbach C D, Cavanaugh C M, (2006). 16S rRNA Phylogenetic investigation of the candidate division "Korarchaeota". *Applied and Environmental Microbiology* **72**: 5077-5082
- Avfall Sverige, (2007).
http://www.avfallsverige.se/m4n?oid=854&_locale=1
Hämtades den 21 maj 2008.
- Bernander R, (1998). Archaea and the cell cycle. *Molecular Microbiology* **29**: 955-961
- Bernander R och Skarstad K, (2000). Mapping of a chromosome replication origin in an archaeon. *Trends in Microbiology* **8**: 535-537
- Blaut M, (1994). Metabolism of methanogens. *Antonie van Leeuwenhoek* **66**: 187-208
- Conrad R, Chan O, Claus P, Casper P, (2007). Characterization of methanogenic Archaea and stable isotope fractionation during methane production in the profundal sediment of an oligotrophic lake (Lake Stechlin, Germany). *Limnol. Oceanogr.* **52**: 1393-1406
- Denman S E, Tomkins N W, McSweeney C S, (2007). Quantification and diversity analysis of ruminal methanogenic populations in response to the antimethanogenic compound bromochloromethane. *FEMS Microbial Ecol* **62**: 313-322
- Embley T M, Finlay B J, (1993). Systematic and morphological diversity of endosymbiotic methanogens in anaerobic ciliates. *Antonie van Leeuwenhoek* **64**: 261-271
- Gao B och Gupta R S, (2007). Phylogenomic analysis of proteins that are distinctive of archaea and its main subgroups and the origin of methanogenesis. *BMC genomics* **8** doi: 10.1186/1471-2167-8-86
- Golyshina O V och Timmis K N, (2005). Ferroplasma and relatives, recently discovered cell wall-lacking archaea making a living in extremely acid, heavy metal-rich environments. *Environmental Microbiology* **7**: 1277-1288
- Graham D E, Overbeek R, Olsen G J, Woese C J, (2000). An archaeal genomic signature. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97**: 3304-3308
- Hohn M J, Hedlund B P, Huben H, (2002). Detection of 16S rDNA sequences representing the novel phylum "Nanoarchaeota": Indication for a wide distribution in high temperature biotopes. *System. Appl. Microbiol.* **25**: 551-554
- Kalmar Biogas AB, (2008).
<http://www.kalmar.se/upload/kvab/externsida/Biogas/Inneh%20o%20analys%202007.pdf>
Hämtades den 3 juni 2008.

Kalmar Vatten, (2007).

<http://www.kalmar.se/upload/kvab/externsida/Biogas/Biogas%202007.pdf>

Hämtades den 26 maj 2008.

Kotelnikova S, (2002). Microbial production and oxidation of methane in deep subsurface. *Earth-Science* **58**: 367-395

Lassey K R, (2007a). Livestock methane emission: From the individual grazing animal through national inventories to the global methane cycle. *Agricultural and Forest Meteorology* **142**: 120-132

Lassey K R, Ulyatt M J, Martin R J, Walker C F, Shelton I D, (1997b). Methane emission measured directly from grazing livestock in New Zealand. *Atmospheric Environment* **31**: 2905-2914

Lastella G, Testa C, Cornacchia G, Notornicola M, Voltasio F, Sharma V K, (2002). Anaerobic digestion of semi-solid organic waste: biogas production and its purification. *Energy Conversion and Management* **43**: 63-75

Lovely D och Klug M J, (1983). Sulfate reducers can outcompete methanogens at freshwater sulfate concentrations. *Applied and environmental microbiology* **45**: 187-192

Lloyd J R och Renshaw J C, (2005). Bioremediation of radioactive waste: radionuclide-microbe interactions in laboratory and field-scale studies. *Environmental biotechnology* **16**: 254-260

Madigan M T, Martinko J M, (2006). *Brock Biology of Microorganisms*. 11:e upplagan. Pearson Prentice Hall, Upper Saddle River.

Matte-Tailliez O, Brochier C, Forterre P, Philippe H, (2002). Archaeal phylogeny based on ribosomal proteins. *Mol. Biol. Evol.* **19**: 361-369

McMichael A, Powles J W, Butler C D, Uauy R, (2007). Food, livestock production, energy, climate change, and health. *The Lancet* **370**: 1253-1263

Narihiro T och Sekiguchi Y, (2007). Microbial communities in anaerobic digestion processes for waste and wastewater treatment: a microbiological update. *Current Opinion in Biotechnology* **18**: 273-278

Naturvårdsverket, (2008).

<http://www.naturvardsverket.se/sv/Produkter-och-avfall/Avfall/Hantering-och-behandling-av-avfall/Biologisk-behandling/>

Hämtades den 5 maj 2008.

Newbold C J och Rode L M, (2006). Dietary additives to control methanogenesis in the rumen. *International Congress Series* **1293**: 138-147

Olsen G J och Woese C R, (1997). Archaeal genomics: An overview. *Cell* **89**: 991-994

- Park K, Thompson A G, Marinier M, Clark K, Wagner-Riddle C, (2006). Greenhouse gas emission from stored liquid swine manure in a cold climate. *Atmospheric Environment* **40**: 618-627
- Pedersen K, (1999). Subterranean microorganisms and radioactive waste disposal in Sweden. *Engineering geology* **52**: 163-176
- Purdy K J, Munson M A, Cresswell-Maynard T, Nedwell D B, Embley T M, (2003). Use of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes to investigate function and phylogeny of sulphate-reducing bacteria and methanogenic archaea in UK estuary. *FEMS Microbiology Ecology* **44**: 361-371
- Schäfer G, Engelhard M, Müller V, (1999). Bioenergetics of the Archaea. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **63**: 570-620
- Skillman L C, Evans P N, Naylor G E, Morvana B, Jarvis G N, Joblin K N, (2004). 16S ribosomal DNA-directed PCR primers for ruminal methanogens and identification of methanogens colonising young lambs. *Anaerobe* **10**: 277-285
- Statens strålskyddsinstitut, (2007).
http://www.ssi.se/Avfall/omravfall_katforv.asp?Menu2=Avfall&Menu3=1&Menu4=13
Hämtades den 5 maj 2008.
- Uppsala Kommun ,(2008).
http://www.uppsala.se/upsala/templates/StandardPage_26892.aspx
Hämtades den 3 juni 2008.
- Vedrenne F, Béline F, Dabert P, Bernet, (2007). The effect of incubations on the laboratory measurement of the methane producing capacity of livestock wastes. *Bioresource Technology* **99**: 146-155
- Verburn P H, Denier van der Gon H A C, (2001). Spatial and temporal dynamics of methane emissions from agricultural sources in China. *Global Change Biology* **7**: 32-47
- Viéitez E R och Ghosh S, (1999). Biogasification of solid wastes by two-phase anaerobic fermentation. *Biomass and Bioenergy* **16**: 299-309
- Walsby A E, (2005). Archaea with square cells. *Microbiology* **13**: 193-195
- Whitman W B, Bowen T L, Boone D R, (2006). The Methanogenic Bacteria. I: Stackebrandt E, Huber H, Schumann P, Stetter K, Goodfellow M, Whitman W, Boone D, Schaal K, Kroppenstedt R, Eytushenko L, *The Prokaryotes* volym 3 pp 719-759. Springer New York.
- Woese C R, (1996). Phylogenetic trees: Whither microbiology? *Current biology* **6**: 1060-1063
- Woese C R, Kandler O, Wheelis M L, (1990). Towards a natural system of organisms: Proposal for the domains Archaea, Bacteria and Eucarya. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **87**: 4576-4579

Yanagita K, Kamagata Y, Kawaharasaki M, Suzuki T, Nakamura Y, Minato H, (2000). Phylogenetic analysis of methanogens in sheep rumen ecosystem and detection of *Methanomicrobium mobile* by Fluorescence *In Situ* Hybridization. Biosci. Biotechnol. Biochem **64**: 1737-1742