

Dissertation

**Aktivierung von Stickstoff
an Eisensulfidoberflächen
– ein präbiotisches Nitrogenase-Modell ?**

Dissertation

Zur Erlangung des akademischen Grades doctor rerum naturalium
(Dr.rer.nat.)

Erster Gutachter: Prof. Dr. Wolfgang Weigand

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Günter Kreisel

Dritter Gutachter: Prof. Dr. Dr. Bernhard K. Keppler

Öffentliche Verteidigung: 19. Mai 2004

Vorgelegt dem Rat der Chemisch-Geowissenschaftlichen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena

**von Diplomchemiker Mark Dörr
geboren am 15.1.1969 in Wiesbaden**

Aus einem indianischen Schöpfungsmythos

Before this Earth existed, there was only water. It stretched as far as one could see, and in that water there were birds and animals swimming around. Far above, in the clouds, there was Skyland. In that Skyland there was a great beautiful tree. It had four roots which stretched to each of the sacred directions, and from its branches all kinds of fruits and flowers grew.

There was an ancient chief in the Skyland. His young wife was expecting a child, and one night she dreamed that she saw the Great Tree uprooted. The next morning she told her husband the story. He nodded as she finished telling her dream. "My wife," he said, "I am sad that you had this dream. It is clearly a dream of great power and, as is our way, when one has such a powerful dream we must do all that we can to make it true. The Great Tree must be uprooted."

Then the ancient chief called the young men together and told them that they must pull up the tree. But the roots of the tree were so deep, so strong that they could not budge it. At last the ancient chief himself came to the tree. He wrapped his arms around it, bent his knees and strained. At last, with one great effort, he uprooted the tree and placed it on its side. Where the tree's roots had gone deep into the Skyland there was now a big hole. The wife of the chief came close and leaned over to look down, grasping the tip of one of the Great Tree's branches to steady her. It seemed as if she saw something down there, far below, glittering like water. She leaned out further to look and, as she leaned, she lost her balance and fell into the hole. Her hands slipped off the tip of the branch, leaving her with only a handful of seeds as she fell, down, down, down, down....

Für meine Eltern

Brigitte Dörr

und

Günter Dörr

Danke !

An erster Stelle will ich meinen Eltern danken, besonders meiner Mutter, die mich mit steter Beharrlichkeit von meinen Phantasien als Entwicklungshelfer, Pianist, Drehbuchautor, Architekt und Kindergärtner immer wieder auf den "soliden Weg" der Chemie zurückbewegt hat. Auch dafür möchte ich meinen Eltern danken, dass beide mir meine langen und intensiven Studien sowohl zeitlich wie auch finanziell ermöglicht haben.

Ein besonders herzlicher Dank gilt auch meinem „Doktor-Vater“, Professor Dr. Wolfgang Weigand für seine endlose Geduld, sein wissenschaftliches Engagement, seine "väterliche Fürsorge". Ihm möchte ich danken für die vielen fruchtbaren und unfruchtbaren spätabendlichen, manchmal auch nächtlichen Diskussionen; für den Humor, den er in schwierigen Situationen immer bewahrt hat. Es war e' woare Freid'.

Ebenso will ich meinem „Zweitbetreuer“, Professor Dr. Günter Kreisel, danken für das Ideenfeuerwerk, das bei jedem Treffen losbrach, für die aufrichtigen, fruchtbaren Diskussionen, für die Effizienz und Professionalität, mit der er Entscheidungen traf und für die Möglichkeit in seiner Arbeitsgruppe zu arbeiten - ich will ihm fleißigere Doktoranden wünschen, die mehr seiner Ideen umsetzen können.

Ein ganz besonders lieber Dank gilt Frau Renate Grunert für ihre Unterstützung in allen Bereichen: Für die Geduld, die sie mit mir hatte. Dafür, dass sie mit großem Engagement ihre Erfahrung in die Experimente hat einfließen lassen. Dass sie immer wieder den Mut und Willen hatte weiterzumachen, als ein monatelanges Experiment zu Bruch ging. Für die ausdauernde Betreuung der Apparaturen an so manchem Wochenende und so manchen Feiertag, an dem sie aus „Wickerschd geflitzt“ kam, um nachzuschauen, ob noch alles „fein blubbert“. Meinem Kollegen Johannes Kälbhofer möchte ich danken für die vielen experimentellen Vorbereitungen, Vorarbeiten und die Zeit, die er während der Arbeiten an seiner Promotion für die Experimente an den Apparaturen geopfert hat. Ihm möchte ich für die Ideen, Fragen und Anregungen danken und für seine brillanten Problemanalysen. Ebenso danke ich Frau Marina Sammler für die Unterstützung und ihr Engagement beim Aufbau der Apparatur und auch für so manches Wochenende und manchen Feiertag, an dem sie zur Kontrolle des Reaktors — oder seiner Überreste — im Institut vorbeikam.

Meinen Kolleginnen und Kollegen Claudia Wolf, Susann „Susi“ Meyer, Roger Gorges und Dana Kralisch möchte ich für die vielen kleinen und großen Dinge danken, bei denen sie mir geholfen haben und für die nette Arbeitsatmosphäre in der Kreisel'schen Arbeitsgruppe. Hier müßte ich jetzt fast alle Mitarbeit der „Technischen Chemie“ aufzählen, denn jeder war bereit, mitzuhelfen und dazu beizutragen, dass die Experimente gelingen. Jeder von ihnen trug durch seine Originalität zu der schönen Arbeitsatmosphäre in der „Technischen Chemie“ bei. Exemplarisch will ich hier noch nennen Herrn Wolfgang Fährdrich, Erwin Ludwig, Claudia Palik, Jan Litka,

Heiko Will, Ralf Bierbaum, Thomas „Tom“ Dittmar, Kristina Dubnak, Frau Fährdrich und den „guten Geist der TC“ Frau Lienig.

Meinen Kollegen Silvio Bräutigam, Sven Herms, Alexander Martin, Holm Pätzold, Carsten Roll, Claudia Rothenburger und Karsten Schubert aus der Arbeitsgruppe Weigand möchte ich für das gute, angenehme Arbeitsklima auf der „Denk-Alm“ danken.

Heike Geilmann, Stephan Bräunlich, Roland A. Werner und Willi Brand vom Max-Planck-Institut für Biogeochemie möchte ich für ihre spontane Bereitschaft danken, hunderte von Messungen auf sich zu nehmen, und für die Zeit, die sie sich genommen haben für die Diskussion der Ergebnisse, die Erklärungen zur Interpretation und für die Einführung in eine für mich neue analytische Welt mit ungewohnten Gesetzmäßigkeiten.

Herrn Wolfgang „Wolle“ Poppitz möchte ich für seine kritischen Überlegungen, seine Hilfe bei der Massenspektrometrie und die vielen Messungen, die wir, aus immer wieder aufgetauchten unglücklichen Umständen heraus, nicht zu Ende führen konnten, danken.

Herrn Professor Dr. Christian Robl danke ich für das Korrekturlesen der Publikationen und die Ermöglichung der vielen röntgendiffraktometrischen Messungen. Daran schließt sich auch mein Dank an seine engagierte Mitarbeiterin, Frau Dipl.-Ing. (FH) Christine Apfel an, die sich viel Zeit für die schwarzen Proben aus der „Ursuppe“ und die Auswertung der „Peaks“ genommen hat.

Herrn Dr. Günter Völtsch aus der „Glaschemie“ möchte ich für die gelungenen, schönen elektronenmikroskopischen Aufnahmen der Eisensulfidteilchen danken; und Professor Dr. Jürgen Popp aus der „Physikochemie“ für die ersten Raman-Spektren.

Dr. Thomas Heinze und Dr. Stephan Völker danke ich für Zurverfügungstellung und Einweisung der Druckapparatur. Herrn Dr. Rolf Russow und seinen Mitarbeitern vom UFZ Halle möchte ich für die Stickoxidmessungen und die anregenden Diskussionen danken. Analytik Jena danke ich für die Stickstoffanalysen. Der Deutschen Forschungsgemeinschaft möchte ich für die großzügige finanzielle Förderung des Projektes und meiner Stelle im Rahmen des Sonderforschungsbereiches 436 danken.

Bei Christian Abel möchte ich mich für die professionellen Farbdrucke und die originellen Ideen beim Korrekturlesen bedanken.

Nicht zuletzt will ich meiner kleinen Familie - Rea und Hannah - für ihre Geduld, für die Zeit, die ich für die Beschäftigung mit dieser Arbeit brauchte und für ihr Verständnis, dass ich nicht immer bei ihnen sein konnte, danken.

Zusammenfassung des Inhaltes (Abstract)

In der vorliegenden Arbeit wird eine Methode beschrieben, um NH_3 aus N_2 unter Verwendung von H_2S als Reduktionsmittel in Anwesenheit von frisch gefälltem Eisensulfid herzustellen. Diese Reaktion könnte als präbiotisches Modell für die Fe-only-Nitrogenaseenzyme wirken. Sowohl das Reduktionsmittel wie auch die Reaktionsbedingungen (Atmosphärendruck des Stickstoffs und Temperaturen zwischen 70 und 80°C) sind ähnlich wie in biologischen Prozessen sehr mild. Die treibende Kraft der Gesamtreaktion ist die Oxidation des Eisensulfides zu Eisendisulfid und die Bildung von Wasserstoff aus H_2S .



Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	13
1.1 Einführung.....	13
1.2 Eine Auswahl der chemischen Theorien zur Lebensentstehung.....	15
1.2.1 Theorie der heteroautotrophen Entstehung des Lebens[6].....	15
1.2.2 Theorie vom chemoautotrophen Ursprung des Lebens.....	16
1.3 Präbiotische Stickstofffixierung.....	18
1.3.1 Zusammensetzung und Beschaffenheit der Uratmosphäre.....	19
1.4 Nitrogenase.....	20
1.5 Nitrogenase-Modelle in nicht wässrigem Milieu.....	27
1.5.1 Stickstofffixierungsmodell von Chatt et al.....	27
1.5.2 Dieisendiazanionkomplex.....	28
1.5.3 Stickstofffixierungsmodell von Yandulov und Schrock et al.....	29
1.5.4 Weitere Distickstoffkomplexe.....	30
1.6 Nitrogenase-Modelle im wässrigem Milieu.....	30
1.7 Vorstellungen zum Mechanismus der Stickstoffreduktion.....	32
1.7.1 Haber-Bosch-Verfahren.....	32
1.7.2 Mononuklearer Stickstoffkomplex am Mo.....	34
1.7.3 Dinukleare Distickstoffkomplexe am Fe.....	34
1.8 Thermodynamische und kinetische Betrachtungen zur Stickstoffreduktion.....	35
1.9 Eigenschaften des Eisensulfides.....	35
1.10 Eisensulfid Mikro- und Nanopartikel.....	36
1.11 Ausgangsfragestellung.....	39
2 Methoden und Experimentelles	40
2.1 Experimentierstrategie.....	40
2.2 Das Stickstofffixierungsexperiment.....	44
2.2.1 Aufbau der Stickstofffixierungsapparatur.....	44
2.2.2 Prozesssteuerung.....	46
2.2.2.1 Gasflusssteuerung.....	48
2.2.2.2 Pumpensteuerung - definierte Sulfidfällung.....	48
2.2.2.3 pH-Wert-Steuerung.....	49
2.2.2.4 Prozessdatenerfassung.....	49
2.2.3 Stickstofffixierungsexperiment im „pilot plant“ Maßstab.....	49
2.2.4 ¹⁵ N-Isotopenmarkierungsversuche im „pilot plant“ Maßstab.....	50
2.2.5 NH ₃ -Analytik.....	51

2.2.5.1	Vorbereitung der Ammoniumproben.....	51
2.2.5.2	Ammonium-Schnelltests.....	51
2.2.5.3	Enzymatischer Ammoniak-Test	53
2.2.6	Besonderheiten der ^{15}N -Isotopenmarkierungsexperimente	54
2.2.6.1	Definition des δ -Wertes.....	55
2.2.6.2	Probenvorbereitung für die ^{15}N -Isotopenanalytik.....	55
2.2.6.3	^{15}N -Isotopenanalytik (IRMS)	56
2.2.6.4	Synthese von Li_3N zur Bestimmung des Stickstoffisotopen- Verhältnisses.....	56
2.2.7	Isotopenverdünnungsexperimente.....	58
2.3	Apparativ analytische Methoden.....	58
2.3.1	Isotopen-Massenspektrometrie (IRMS-Methode).....	58
2.3.1.1	IRMS-Apparatur.....	58
2.3.1.2	Die IRMS-Meßsequenz.....	60
2.3.1.3	Mehrstufige Kalibration bei der IRMS.....	61
2.3.2	Röntgenpulverdiffraktometrie.....	62
2.3.2.1	Präparation der Proben aus Gruppe (1) und (2)	62
2.3.2.2	Präparation der Proben aus Gruppe (3).....	62
2.3.3	Raman-Spektroskopie.....	63
2.4	N_2 -Aktivierung im UV-Licht.....	64
2.5	Herstellung von mikro- und nanopartikulären Eisensulfiden.....	65
2.5.1	Rasterelektronenmikroskopie (REM).....	66
2.5.1.1	Präparation der frisch gefällten Eisensulfidproben.....	66
2.5.1.2	Präparation der Eisensulfid Mikro- und Nanopartikelproben.....	66
2.5.2	Transmissions-Elektronenmikroskopie (TEM).....	66
2.5.3	Elektronenstrahlmikroanalyse (EDX)	67
2.6	Ergebnisse der Untersuchung von Eisensulfid Mikro- und Nanopartikeln.....	68
2.6.1	Rasterelektronenmikroskopie der Eisensulfidpartikel.....	68
2.6.2	Transmissions Elektronenmikroskopie der Eisensulfidpartikel.....	68
2.6.3	Elektronenstrahlmikroanalyse der Eisensulfidpartikel.....	69
3	Zusammenstellung der Ergebnisse.....	70
3.1	Die Herstellung von Ammoniak in der Pilotanlage.....	70
3.1.1	Erläuterungen zu den Versuchen 1-13 in Tabelle 1.....	72
3.2	Abschätzung der möglichen Verunreinigungen der Reagenzien mit Ammoniak und Ammoniumsalzen.....	74
3.3	Stickstofffixierung in der UV-Belichtungsanlage.....	75
3.4	Ergebnisse der Untersuchung des in den Stickstofffixierungsexperimenten verwendeten Eisensulfides.....	76
3.4.1	Röntgenpulverdiffraktometrie.....	76

3.4.2	Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen von frisch gefälltem Eisensulfid.....	77
3.4.3	Raman Spektroskopie.....	78
4	Zusammenfassung und Schlussfolgerungen	79
5	Ausblicke.....	80
6	Literatur.....	82
7	Verzeichnisse.....	89
7.1	Abbildungsverzeichnis.....	89
7.2	Tabellenverzeichnis.....	90
7.3	Verzeichnis eigener Publikationen.....	90
7.4	Vorträge	91
7.5	Poster.....	91
8	Index.....	92
9	Appendix	94
9.1	Nachweisreaktion der verwendeten MERCK-Ammoniak Schnelltests.....	94
9.1.1	Methode.....	95
9.2	Auswertung des Isotopenverdünnungsexperimentes.....	96
9.3	Analyse der Stickoxide in der Stickstoffisotopenmischung.....	98
9.4	HP VEE 5.0 NH3Ctrl.....	99
9.4.1	Hardwarekonfigurationsschema.....	99
9.4.2	Bedienungsanleitung.....	100
9.4.2.1	Programmstart.....	100
9.4.2.2	Erste Schritte.....	100
9.4.3	Hauptfenster.....	102
9.4.4	Programmaufbau.....	103
9.4.5	Status des Programms.....	104
9.4.6	Gasfluß Modul.....	105
9.4.7	Gasfluß output.....	106
9.4.8	Pumpenmodul	107
9.4.9	Pumpenprogramm.....	108
9.4.10	Pumpenmodul.....	109
9.4.11	pH-Control	110
9.4.12	pH-Kalibrationsmodul.....	111
9.4.13	pH-Kalibrations-Programm.....	112
9.4.14	pH-Steuerung	114
9.4.15	pH-Control.....	115
9.4.16	pH-Kontrolle (Kern mit PID-Regelung).....	116
9.4.17	Dokumentationsmodul.....	117
9.4.18	Variabler Teil der Tabellendokumentation.....	118

Abkürzungen

Allgemein

e.g.	zum Beispiel (ex emplum gr atia)
eq.	molare Äquivalente (eq uivalents)
f.,ff.,fff.	f olgende
ggf.	g egebenenfalls
i.e.	das ist (id est)
Lsg.	L ösung
Lsgm.	L ösung s mittel
RM	R eaktions m ischung
r. t.	Raumtemperatur (<i>r</i> oom <i>t</i> emperature)

Einheiten

Mrd.	M illi ard en (10^9)
M	M olar
N	N ormal
mM	m illi m olar
ppm	p arts p er m illion
ppb	p arts p er b illion

Geräte

RK	R und k olben
EK	E rlenmeyer k olben
IRMS	Isotopenverhältnis Massenspektrometrie (I sotope R atio M ass S pectrometry)

1 Einleitung

1.1 Einführung

Wie könnte sich Ammoniak (NH_3) in präbiotischer Zeit aus Distickstoff (N_2) gebildet haben? Diese Schlüsselfrage ist bis heute noch weitgehend ungeklärt. Um so größer ist die Herausforderung an die Chemiker, tiefere Einblicke in diesen zentralen Prozess zu gewinnen. Ammoniak hat für alle Lebewesen eine essentielle Bedeutung, da molekularer Stickstoff erst in Ammoniak umgewandelt werden muß, bevor er von den Lebewesen genutzt und in Biomoleküle eingebaut werden kann. Die Aktivierung von N_2 erfolgt dabei enzymatisch. Stickstoff bestimmt bei nahezu allen lebenswichtigen Molekülen wie Aminosäuren, Proteinen, RNA, DNA und Lipiden - als Heteroatom - entscheidend deren Eigenschaften und ermöglicht ihre vielfältigen und einzigartigen Fähigkeiten, wie Katalyse, Strukturgebung, Stofftransport, Informationsspeicherung, Stofferkennung und Reproduktion.

Auch in technischen Prozessen nimmt Ammoniak eine zentrale Rolle ein; so gehört er zu den weltweit am meisten produzierten Grundchemikalien und dient als Ausgangsstoff für zahlreiche Synthesen von Kunstdüngern, Kunststoffen und Farben.

Es drängt sich die Frage auf, wie in einer Zeit vor der Entstehung von Stickstoffaktivierenden Enzymen molekularer Stickstoff zu Ammoniak reduziert wurde. Es wird angenommen, dass Distickstoff, der in der belebten Natur durch Eisen-Schwefel-Enzyme fixiert wird, in präbiotischer Zeit an der Oberfläche von Eisensulfid aktiviert wurde^{[1][2]}.

Stickstofffixierende Bakterien produzieren aus N_2 schätzungsweise $1,7 \times 10^8$ t NH_3 pro Jahr^[3]. Diese Reaktion wird von *Nitrogenase-Enzymen* katalysiert und läuft unter sehr milden Bedingungen bei Atmosphärendruck (10^5 Pa) und Umgebungstemperatur (273 - 323 K) ab. Die Einzelheiten des Mechanismus dieser Reaktion sind noch weitgehend unbekannt und Gegenstand intensiver Diskussion^[4]. Neuen Antrieb für Untersuchungen gab die kürzlich publizierte, hochauflösende Röntgeneinkristallstrukturanalyse des Nitrogenase-FeMo-Proteins aus *Azotobacter vinelandii*^[5]. Das FeMo-Protein enthält den FeMo-Cofactor, der zwei Cuban-ähnliche **Eisen-Schwefel-Cluster** $[\text{4Fe:3S}]$ und $[\text{Mo:3Fe:3S}]$ beherbergt, die durch Sulfidliganden verbrückt sind. In dem von ihnen umschlossenen Hohlraum ist ein Leichtatom – *vermutlich Stickstoff* – koordiniert.

Die weit verbreiteten und häufig auftretenden Elemente Eisen und Schwefel spielen also eine wichtige Rolle sowohl in dem Prozess der Stickstofffixierung wie auch der

lebhaft diskutierten Theorie des chemoautotrophen Ursprungs des Lebens in einer urzeitlichen Eisen-Schwefel-Welt^[1]. Sind die Eisen-Schwefel-Cluster in den aktiven Zentren der Nitrogenasen „Relikte“ einer archaischen Eisen-Schwefel-Welt ?

In dieser Arbeit wird eine Methode beschrieben, NH_3 aus N_2 unter Verwendung von *in situ* entstehendem H_2S als Reduktionsmittel in Anwesenheit von frisch gefälltem Eisensulfid herzustellen. Sowohl das Reduktionsmittel wie auch die Reaktionsbedingungen (Atmosphärendruck des Stickstoffs und Temperaturen zwischen 70 und 80°C) sind ähnlich wie in biologischen Prozessen sehr mild. Die treibende Kraft der Gesamtreaktion ist die Oxidation des Eisensulfides zu Eisendisulfid und die Bildung von Wasserstoff aus H_2S nach folgendem Reaktionsschema:



1.2 Eine Auswahl der chemischen Theorien zur Lebensentstehung

Um die Ideenquellen für die vorliegende Arbeit näher verstehen - und damit die Wahl der experimentellen Bedingungen - sowie die Begriffe „autotroph“, „chemoautotroph“ und „heterotroph“ erklären zu können, sei hier eine kleine Einführung in die Theorien zur Lebensentstehung gegeben.

1.2.1 Theorie der heteroautotrophen Entstehung des Lebens^[6]

Es ist eine Grundfrage der Menschen, wie Leben entstanden ist. Frühe chemische Antworten begann man im ersten Drittel des achtzehnten Jahrhunderts zu geben, als *Friedrich Wöhler* 1828 die Synthese von Harnstoff aus Silbercyanid und Ammoniumchlorid gelang^[7] und 1850 *Adolph Strecker* Alanin aus Acetaldehyd, Ammoniak und Blausäure herstellen konnte^[8]. Intensiv haben sich dann *Oparin* und *Haldane* mit dieser Frage auseinandergesetzt^[9]: sie postulierten, ausgehend von *Charles Darwins* Idee vom „warmen, kleinen Teich“, schon am Anfang des zwanzigsten Jahrhunderts (um 1920) den Ursprung des Lebens in einer „heterotrophen Ursuppe“ in der alle für erstes Leben notwendigen Verbindungen vorhanden waren und Leben dann durch „zufällige“ Synthesen in einem Jahrmillionen dauernden Prozess mit steter Selektion und Mutation entstehen konnte. Die Bausteine dieser einfachen Lebewesen seien durch abiotische Prozesse wie elektrische Entladung, UV-Strahlung, Vulkanismus u.a. in einer reduktiven Atmosphäre aus Methan/[Kohlendioxid (Haldane)], Ammoniak, [Wasserstoff(Oparin)] und Wasserdampf entstanden. Experimentell konnte *Walther Löb* 1913 sowohl mit einer Lichtbogenapparatur als auch mit einer UV-Apparatur zeigen, dass einfache Aminosäuren, wie Glycin, aus wässrigem Formamid entstehen^[10].

Am nachhaltigsten haben die Arbeiten von *Harold C. Urey* und *Stanley L. Miller* im Jahre 1953 die „Ursuppentheorie“ unterstützt. So publizierte *Miller* 1953 einen Versuch, in dem er Wasser, Methan, Ammoniak und Wasserstoff in einer Umlaufapparatur elektrischen Bogenentladungen aussetzte^[11], dabei bildeten sich eine ganze Reihe von Biomolekülen, u.a. Alanin und Glycin. *Miller* griff die von *Oparin* und *Haldane* vertretenen Ideen auf und postulierte die Entwicklung einfachen Lebens durch spontane Molekülassoziation und Evolution der vor etwa 3,8 Mrd. Jahren in der „Ursuppe“ vorhandenen Moleküle in heterotropher¹ Weise, das heißt „sich von vorhandenen reduzierten Kohlenstoffverbindungen ernährend“, zu immer komplexeren

1 ητερος (gr.) = andersartig, verschieden; τροφε (gr.) = Nahrung

Organismen und hin zu den heute bekannten Lebewesen. Jedoch konnte in den auf dem *Miller-Versuch* aufbauenden Experimenten nur Di- und Tripeptide gefunden werden. So geriet diese Theorie, bei der sich Leben in einer wässrigen Lösung von Lebensbausteinen spontan entwickelt habe, mehr und mehr in Kritik.²

1.2.2 Theorie vom chemoautotrophen Ursprung des Lebens

Dieses Dilemma konnte *Günter Wächtershäuser* mit seiner Theorie umgehen und stellte 1988 ein ganzes Gebäude von möglichen Aufbaureaktionen vor^{1)[2]}. Seine Kernaussage ist die Evolution von einfachen, lebensähnlichen Reaktionszyklen zu komplexeren Systemen an geladenen, mineralischen Oberflächen wie zum Beispiel **Eisensulfiden (Pyrit, u.a.)**. Diese Reaktionszyklen seien die Vorläufer der heutigen zellulären Zyklen. Ihre Energie bezögen sie - im Gegensatz zu *Millers Theorie* - aus ihrer Umgebung durch die Oxidation leicht oxidierbarer, kleiner Moleküle wie z.B. H_2S , S^2- . Da diese leicht oxidierbaren Moleküle die Zyklen „am Leben erhalten“, wird ihre Lebensweise als „chemoautotroph“⁴³ bezeichnet. Eine der wichtigsten Aussagen dieser Theorie ist die Postulierung der Reaktionszyklen an Oberflächen („two dimensional surface metabolism“), da hier viele Aufbaureaktionen thermodynamisch begünstigt seien - im Gegensatz zu Reaktionen, die frei in einer „Ursuppe“ stattfinden könnten. Hier liegt die wesentliche Differenz zu *Darwins*, *Oparins* und *Stanley L. Millers* Vorstellungen von einer Lebensentstehung in einem „Urozean“.

2 die Beschreibung darauf aufbauender Theorien, wie die der „Tonmineral-Welt“, der „RNA-Welt“, der „PNA-Welt“, etc. würden den Rahmen sprengen.

3 chem. = chemisch; αυτο (gr.) = selbst; τροφή (gr.) = Nahrung

Günter Wächtershäuser postuliert für die chemoautotrophe Lebensentstehung sechs Bedingungen^[12]:

- (i) Die ersten Organismen lebten von CO oder CO₂ an Orten hoher Vulkanaktivität oder an hydrothermalen Quellen.
- (ii) Ihr Metabolismus basierte auf der reduktiven Bildung von Methylmercaptan (Methanthiol, CH₃SH) und der dann folgenden Carbonylierung zu aktivierter Thioessigsäure (H₃CO-SH) - ähnlich der des reduktiven Acetyl-Coenzym-A(CoA) Stoffwechselweges.
- (iii) Aktivierte Thioessigsäure (H₃CO-SH) wurde in einem Kohlenstofffixierungszyklus genutzt - ähnlich dem reduzierenden Zitratzyklus.
- (iv) Diese Stoffwechselwege bezogen ihre reduzierenden Kräfte aus der oxidativen Bildung von Pyrit aus Eisensulfid und Schwefelwasserstoff.
- (v) Alle chemischen Umwandlungen geschahen in einer Ligandensphäre, die durch Bindung an **Eisen-Schwefel-Mineral-Oberflächen** gebildet wurde. Übergangsmetallionen wie Ni²⁺, Co²⁺ oder Se wirkten dort katalytisch.
- (vi) Nachfolgende evolutionäre Schritte schlossen die Ersetzung von Thiocarbonsäuren durch Thioester und die Umwandlung von Seitenprodukten (wie Aminosäuren) zu Biokatalysatoren ein.

Diese Schritte stellen eine doppelte Rückkopplung sowohl in den Kohlenstofffixierungszyklus als auch in ihren eigenen Bildungsweg mittels Ligandenbeschleunigung der Übergangsmetallsulfide - als katalytische Zentren - dar. Damit kann der Substanzaufbau in steter Weise unterhalten werden und trägt - neben der Selbsterhaltung - zur fortwährenden „Über“-Produktion von evolvierbaren Verbindungen bei.

Die erst in den letzten Jahrzehnten wegen ihrer schweren Zugänglichkeit näher untersuchten heißen, vulkanischen Quellen auf dem Ozeangrund (sog. „black-smoker“⁴) zeigen extreme Reaktionsbedingungen, wie sie für manche der von *Wächtershäuser* postulierten Reaktionen notwendig sind. So wurden dort hohe Konzentrationen an Schwefelwasserstoff, Metallsulfiden - wie Eisensulfide -,

4 Der Name „black smoker“ rührt von den heißen, sulfidhaltigen, rußig-schwarzen, rauchwolkenähnlich aufsteigenden Lösungen dieser Quellen her.

Kohlendioxid, steile pH- und Wärmegradienten gefunden. Wegen dieser besonderen chemischen Umgebung könnten diese Quellen auch in der Urzeit Orte der Synthese von Lebensbausteinen - oder gar Orte der Lebensentstehung - gewesen sein.

1.3 Präbiotische Stickstofffixierung

In den vorherigen Kapiteln wurde schon auf den Stellenwert der verbreiteten und häufig auftretenden Elemente Eisen und Schwefel in dem Prozess der Stickstofffixierung und der lebhaft diskutierten „Theorie des chemoautotrophen Ursprungs des Lebens in einer urzeitlichen Eisen-Schwefel-Welt“^[1] hingewiesen. Die Idee, dass N_2 im frühen Präkambrium⁵ gemäß Reaktionsgleichung (1) zu einer Reaktion, bei welcher Stickstoff zu NH_3 in Anwesenheit von Eisensulfid und Schwefelwasserstoff reduziert worden sein könnte, wurde durch diese Theorie angeregt.

Vermutlich ist diese Modellreaktion (1) nicht die einzig mögliche Quelle für Ammoniak in der Frühzeit der Erde; vielmehr sind eine Reihe von Ammoniakquellen denkbar, u.a. :

- atmosphärische Entladungen (Blitze)
- Reaktionen in der oberen Atmosphäre mit energiereicher Strahlung (UV- und γ -Strahlung)
- Gasausstoß durch Vulkanismus
- heiße Quellen im Urozean (analog den heutigen „black smokers“)
- auch Meteoriten können Ammoniumsalze und Stickstoffverbindungen auf die Erde gebracht haben.

Dennoch wären die aus der Modellreaktion (1) entstandenen Mengen Ammoniaks - besonders wenn die langen, geologischen Zeiträume und die Reaktionsvolumina im Urozean betrachtet werden - nicht vernachlässigbar.

Aus zwei Gründen ist es für die zunächst postulierte Reaktion (1) wichtig, die Zusammensetzung der urzeitlichen Atmosphäre zu kennen:

1. *War - als triviale Voraussetzung für die Reaktion (1) - hinreichend viel Stickstoff vorhanden ?*

5 Präkambrium: Erdzeitalter < 1,5 Mrd. Jahren; der Name meint „Zeit vor dem Kambrium“. Das Kambrium ist benannt nach den kambrischen Bergen in Nord-Wales (Cambria = römischer Name für das nördliche Wales).

2. *Waren in der Atmosphäre größere Mengen Sauerstoff vorhanden ?* - In diesem Falle ist eine großflächige Präsenz von Eisen(II) auf der Erde eher unwahrscheinlich. Eine niedrige Sauerstoffkonzentration oder gar seine Abwesenheit würde jedoch unsere experimentellen Bedingungen rechtfertigen.

1.3.1 Zusammensetzung und Beschaffenheit der Uratmosphäre

Nach wie vor sind die Vorstellungen über die genaue Zusammensetzung der Atmosphäre, wie sie vor circa 3,8 Mrd. Jahren auf der Erde vorherrschte, sehr umstritten und werden, auch wegen der daraus resultierenden Implikationen, leidenschaftlich diskutiert. In der Literatur haben sich - in vereinfachter Darstellung - zwei Lager gebildet: Die Gruppen um *Stanley L. Miller* postulieren eine eher **stark bis mittelschwach reduzierende** Atmosphäre der ungefähren Zusammensetzung CO, CO₂, CH₄, N₂, H₂O^[13].

Das zweite Lager, das sich um Isotopenchemiker wie *Farquhar et al.* gruppiert, vermuten eine **schwach bis ganz schwach reduzierende** Atmosphäre. Sie schätzen, dass vor 2,4 Mrd. Jahren der Sauerstoffanteil in der Luft bei < 1 % lag. Etwa 94 % waren Stickstoff, als restliche Bestandteile werden CO₂ und in geringeren Anteilen CO, Methan und H₂S angegeben^{[14][15]}. Der niedrige O₂-Gehalt wurde aus *massenunabhängiger Isotopenfraktionierung* urzeitlicher Mineralien bestimmt^[15]. Die Temperatur der Erdoberfläche sei durch ein starkes Treibhausgas, z.B. Methan, beeinflusst. *J.F. Kasting et al.* haben in einer Abschätzung des Klimas vor 3,8 Mrd. Jahren eine durchschnittliche Oberflächentemperatur der Erde von etwa 85 °C errechnet^[16] - eine weitere Rechtfertigung für die Bedingungen in unserem Reaktor (Temperatur ca. 80 °C).

Damit wird die erste der beiden im vorherigen Kapitel (1.3) hinterfragten Voraussetzungen von keinem der Wissenschaftler angezweifelt. Auch im zweiten Punkt, dem des Sauerstoffanteils der Atmosphäre, herrscht in beiden Gruppen weitestgehend der Konsens, dass zu Beginn (vor ca. 4,8 Mrd. Jahren) Sauerstoff eher in geringen bis sehr geringen Anteilen in der Luft vorhanden war und sich erst nach und nach - auch, oder besonders, durch die photosynthetische Aktivität von Mikroorganismen - der heutige hohe Sauerstoffanteil der Luft (von derzeit ca. 21 %) gebildet hat. Beide Standpunkte haben weitreichende Implikationen für die Theorien der ersten Organismen-bildenden Reaktionen. Auch für meine Experimente ist diese Frage von Relevanz, so habe ich in einer Arbeitshypothese die Atmosphäre im Reaktor

zunächst auf reinen Stickstoff bzw. Argon beschränkt. Nur ein Reaktionsgas⁶ deshalb, da Reaktionen leichter mit einfacheren Systemen zu untersuchen sind und Spuren von Sauerstoff in unserem „kleinen“ - und im Vergleich zur ganzen Erde - einfachen System die Reaktion zu stark beeinträchtigen würden.

1.4 Nitrogenase

Nach einer aktuellen Schätzung werden durch Organismen jährlich circa $1,7 \times 10^8$ t Ammoniak aus Luftstickstoff gebildet^[3]. Ammoniak dient in der Natur als Bindeglied zwischen den einfachen, niedermolekularen Stickstoffverbindungen (N_2 , NO_2 , Nitrit, Nitrat, etc.) und den für alle Lebewesen essentiellen höhermolekularen Stickstoffverbindungen wie Aminosäuren, Nucleinsäuren und deren hochmolekularen Gebilden, den Proteinen, der RNA/DNA u.a.. Ein Bindeglied ist NH_3 deshalb, da der Luftstickstoff, der ja in großer Menge vorhanden ist (derzeit circa 79% Anteile in der Luft), wegen seiner hohen chemischen Reaktionsträgheit von den meisten Lebewesen nicht direkt aktiviert und umgesetzt werden kann, sondern erst in Ammoniak bzw. Ammonium umgewandelt werden muss, bevor er in die Biosyntheseyklen und den Bio-Kreislauf kommt. Auch die im Boden schon fixierten Stickstoffverbindungen müssen den Weg in den Stickstoffkreislauf über das Ammonium beschreiten.

Unter sehr milden Bedingungen wird atmosphärischer Stickstoff enzymatisch von bestimmten Bakterienstämmen bei Atmosphärendruck und Umgebungstemperatur in NH_3 überführt. Drei Klassen von stickstofffixierenden Enzymen, den Nitrogenasen, sind bisher bekannt, die in ihren aktiven Zentren Eisen, Eisen/Molybdän sowie Eisen/Vanadium an Sulfido-Liganden koordiniert enthalten. Obwohl bereits vor einigen Jahren die Struktur des FeMo-Cofaktors der Fe-Mo-Nitrogenase röntgenstrukturanalytisch aufgeklärt wurde, ist der Mechanismus der N_2 -Fixierung, N_2 -Aktivierung und die Ammoniakbildung noch weitgehend unbekannt^{[17][18][19]}. Nur die Stöchiometrie der N_2 -Fixierung der Fe-Mo-Nitrogenase gilt als geklärt^[20]:



Nitrogenasen kommen in einer Vielzahl von Organismen vor: so sind mindestens 200 Arten in unterschiedlichsten Medien anaerob wie aerob lebender Prokaryonten und Archaeobakterien bekannt. Unter den stickstofffixierenden Bakterien gibt es sowohl frei als auch in Symbiose mit Pflanzen lebende.

⁶ Argon ist - als Edelgas - chemisch inert und dient nur als Schutzgas bzw. Gas für Blindversuche.

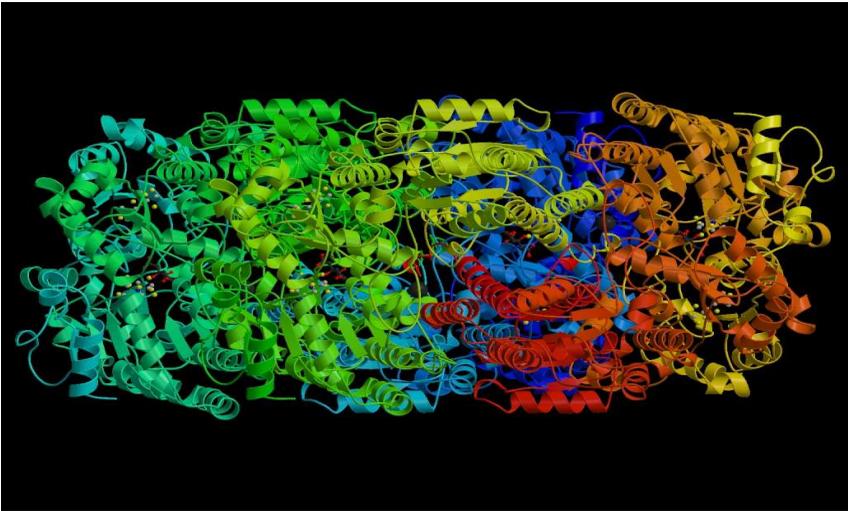


Abbildung 1 Röntgenographische Aufnahme der Nitrogenase (Quelle:PDB - 1MIN, die Darstellung wurde mit dem dortigen Web-Frontend als „Bändermodell“ erzeugt)

Die größte Bekanntheit haben Bakterien der Gattung *Rhizobium*, die in den Wurzelknöllchen von Schmetterlingsblütlern (*Fabaceae*) vorkommen, dazu gehört *Rhizobium leguminosarum*. Mit am besten untersucht sind die im Boden frei lebenden Bakterien *Azotobacter vinelandii* und *Clostridium pasteurianum*. *Azotobacter vinelandii* hat die Besonderheit, je nach Metallangebot des Mediums drei verschiedene Nitrogenasen zu synthetisieren: Neben der FeMo-Nitrogenase kann es bei Molybdänmangel und Vanadiumangebot ein Gen zur Synthese einer FeV-Nitrogenase aktivieren. Unter Mo- oder V-Mangel produziert es eine Nur-Fe-Nitrogenase. Des weiteren ist es in der Lage, Stickstoff unter aeroben Bedingungen zu fixieren, was durch besondere Stoffwechselmechanismen erreicht wird, die um das sauerstoffempfindliche Enzym eine lokale, anaerobe Mikroumgebung schaffen.

Nitrogenasen katalysieren nicht nur die Reduktion des Distickstoffs zu Ammoniak, sondern sind auch in der Lage, Protonen zu Wasserstoff zu reduzieren. In *in vitro* Versuchen mit anderen Substraten gelingt auch die Reduktion von Ethin und Cyaniden

[20]

Das FeMo-Nitrogenase-Enzym⁷ besteht, wie Abbildung 2 schematisch zeigt, aus einem dimeren Metalloproteincomplex, der wiederum aus einem α_2 Dimer, dem **Fe-Protein**, (ca. 60 kDa) und einem $\alpha_2\beta_2$ Tetramer (ca. 250 kDa), dem **FeMo-Protein** aufgebaut ist. Das **Fe-Protein** beherbergt, nach gegenwärtigem Kenntnisstand, einen Fe_4S_4 -Clusterkomplex, der die beiden α -Untereinheiten miteinander verbrückt. Im **FeMo-Protein** befinden sich zwei Fe_8S_7 -Cluster (**P-Cluster**) und im sog.

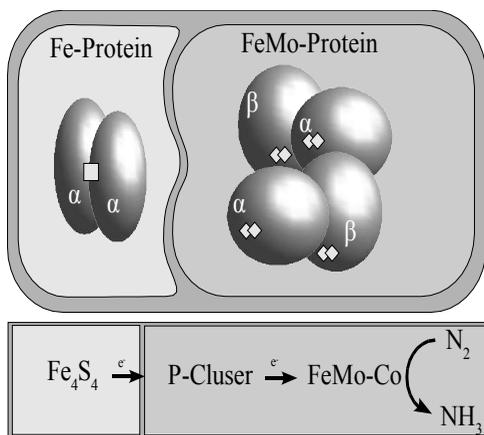


Abbildung 2 oben: Schema der FeMo-Nitrogenase; unten: wahrscheinliche Elektronenübertragungskette [21]

FeMo-Protein zwei paramagnetische MoFe_7S_9 -Cluster ($S = 3/2$), auch **FeMo-Cofaktor**⁸ genannt. Jedes dieser MoFe_7S_9 -Cluster kann als Verbund eines unvollständigen $\text{Fe}_4(\mu_3\text{-S})_3$ -Kubus und eines $\text{MoFe}_3(\mu_3\text{-S})_3$ -Kubus, die über drei zentrale μ_2 -S-Brückenliganden miteinander verbunden sind, angesehen werden (vgl. Abbildung 3). Dieser Clusterkomplex liegt ca. 10\AA (1nm) unter der vorwiegend hydrophilen Oberfläche des FeMo-Proteins. Van-der-Waals- und Dipol-Dipol-Wechselwirkungen zwischen dem Cluster und der Proteinhülle helfen den Clusterkomplex zu stabilisieren. Das pseudo-oktaedrische Mo ist mit einem zweizähligen (R)-Homozitrat- oder in manchen Fällen mit einem Zitrat-Ligand komplexiert. Abbildung 3 zeigt die von *Kim et al.* vorgeschlagene Struktur^[19] des FeMo-Cofaktors.

7 alle anderen Nitrogenasen sind nicht so gut untersucht

8 Es ist möglich, den FeMo-Cofaktor aus dem intakten FeMo-Protein zu isolieren und damit eine mutierte Form des FeMo-Proteins zu aktivieren; deshalb der Name „Cofaktor“. Er wird auch FeMoCo oder „M-center“ genannt.

Der P-Cluster ist zwischen der α - und β -Einheit des FeMo-Proteins lokalisiert und man

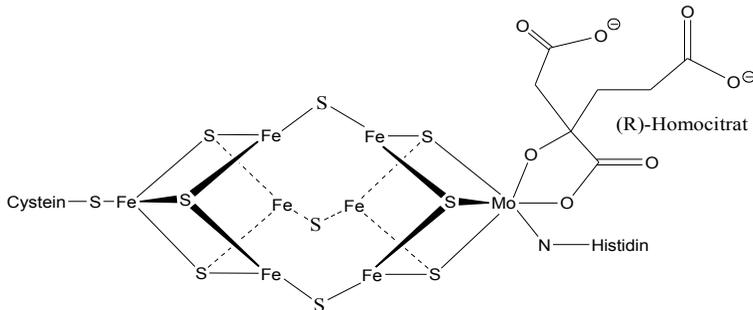


Abbildung 3 Struktur des FeMo-Cofaktors [21]

nimmt an, dass er für die Übertragung der Elektronen vom Fe-Protein zum FeMo-Cofaktor verantwortlich ist. Zur Substratreduktion werden vier Schritte angenommen^[20] (s. unterer Teil des Schemas in Abbildung 3):

- (1) Die Reduktion des Fe-Proteins durch Elektronenüberträger, wie Flavodoxine und Ferredoxine
- (2) Übertragung einzelner Elektronen auf das Fe₈S₇-Cluster (P-Cluster) des FeMo-Proteins in einem MgATP getriebenen Prozess
- (3) Elektronenübertragung vom P-Cluster zum MoFe₇S₉-Cluster (FeMo-Cofaktor) des FeMo-Proteins
- (4) Elektronentransfer auf das Substrat (N₂) im aktiven Zentrum.

Ob das Molybdän eine wichtige Rolle bei der Aktivierung von N₂ spielt, ist nach wie vor umstritten, da aktive Nitrogenasen gefunden wurden, die kein Molybdän enthalten. *Mössbauer-spektroskopische* Untersuchungen schließen aber eine Beteiligung des Molybdäns an dem Stickstoffaktivierungsprozess nicht aus^[21]. Die vereinfachte Stöchiometrie der Gesamtreaktion zeigt Gleichung (2).

Bei jeder Elektronenübertragung vom Fe-Protein auf das FeMo-Protein ist, wie Abbildung 4 zeigt, ein MgATP-abhängiger Dissoziations-/Assoziationsschritt des Proteinkomplexes notwendig. Im einzelnen sind das (vgl. Abbildung 4):

- (1) Bildung eines MgATP-Komplexes mit dem Fe-Protein unter Reduktion des Fe-Proteins,
- (2) Bildung des Fe-Protein-(MgATP)₂-MoFe-Protein-Komplexes,
- (3) Reduktion des MoFe-Proteins durch diesen Komplex,
- (4) ATP-Hydrolyse unter Freisetzung von ADP und Phosphat.

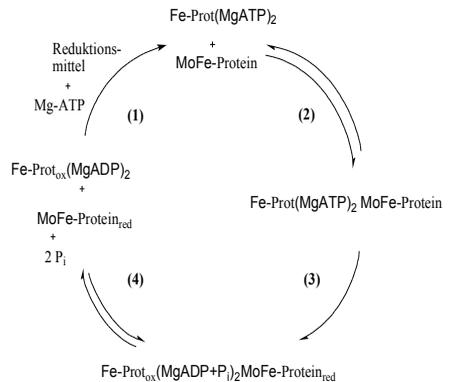


Abbildung 4 Der Oxidations- und Reduktionszyklus des Fe-Proteins der Nitrogenase [22].

Es sind drei Nitrogenase-Typen bekannt:

1. Die FeMo-Nitrogenase, ein Tetramer, das 70 % der Elektronen für die Stickstoffreduktion verwendet. Es ist die am besten untersuchte Nitrogenase. Von ihren Röntgenkristallstrukturaufnahmen stammt auch die in Abbildung 3 skizzierte Struktur des FeMo-Cofaktors.
2. FeV-Nitrogenase, ein Hexamer, das 40 % der Elektronen für die Stickstoffreduktion verwenden kann. Sie ist keine FeMo-Nitrogenase, bei der Mo durch V ausgetauscht wird, sondern besitzt eigene Gene, die zwar Ähnlichkeiten mit denen der MoFe-Nitrogenase aufweisen, jedoch unter anderen Bedingungen exprimiert werden^[23]. FeV-Nitrogenase ist weit weniger untersucht, so gibt es bisher für den FeV-Cofaktor nur einen Strukturvorschlag^[23].
3. Die FeFe- oder „Fe-only/nur-Fe“-Nitrogenase, auch ein Hexamer, das nur 20% der Elektronen für die Stickstoffreduktion verwenden kann. Die Nur-Fe-Nitrogenase ist am wenigsten untersucht. Bisher gibt es von ihr noch keine röntgenkristallographischen Aufnahmen hinreichender Auflösung.

Neben den wichtigen molekularbiologischen und mikrobiologischen Arbeiten^[24] wurde eine ganze Reihe von Modellverbindungen entwickelt, um die Funktion der Nitrogenase und ihre Reaktivität verstehen zu können. Diese Modelle basieren oft auf niedermolekularen Metallkomplexen oder Metallhydroxiden.

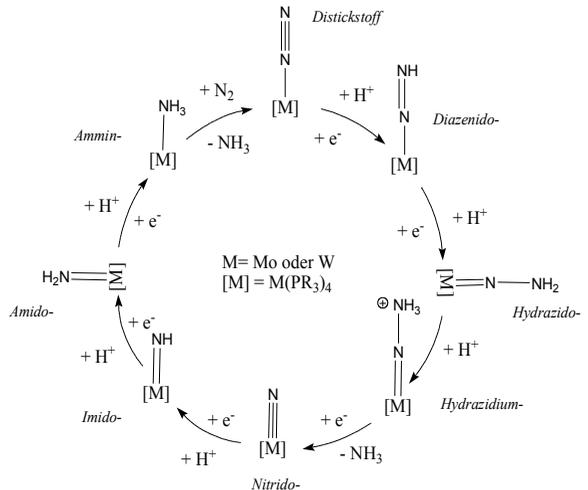
Bisher ist keine synthetische Metall-Schwefel-Verbindung bekannt, die in einer bioanalogen Reaktion Stickstoff katalytisch zu Ammoniak zu reduzieren vermag. Modellüberlegungen zur Klärung der Funktionsweise des FeMo-Cofaktors gehen entweder davon aus, dass das Nitrogenaseenzym molekularen Stickstoff ohne eine Fe-S-Bindungsspaltung in sein Zentrum aufnimmt, oder aber, dass sich eine Fe-S-Fe-Bindung löst, wenn das Enzym vom inaktiven in den aktiven Zustand übergeht. Das N₂-Molekül kann nun an die beiden Eisenzentren koordinieren, protoniert und reduziert werden^{[25][26]}. In den folgenden Abschnitten sollen die wichtigsten chemischen Ansätze für Modellverbindungen – sowohl Strukturmodelle wie auch Funktionsmodelle – vorgestellt werden.

1.5 Nitrogenase-Modelle in nicht wässrigem Milieu

Zahlreiche Experimente zur N_2 -Reduktion in nicht wässrigem Milieu wurden seit den vor 25 Jahren begonnenen Pionierarbeiten von *J. Chatt et al.* unternommen^[27]. Es wurde vorwiegend versucht, an Übergangsmetallkomplexen (Mo, V, Fe) Stickstoff zu koordinieren.

1.5.1 Stickstoffixierungsmodell von Chatt et al.

Eines der ersten Funktionsmodelle, das Stickstoff aktiviert und Ammoniak freisetzt, geht auf *Chatt et al.*^[27] zurück. Sie schlagen, wie Abbildung 5 zeigt, eine primäre end-on Koordination des Stickstoffs am Metallzentrum ($M(PR_3)_4$, $M=Mo, W$) vor. Von dort aus wird der Distickstoff stufenweise durch Protonen- und Elektronenübertragung über diazenido-, hydrazido-, hydrazidium-, nitrido-, imino-, amido, und ammin-Stufen zu Ammoniak reduziert. Nur mit wenigen Verbindungen gelang der vollständige Durchlauf dieses Zyklus. Ein katalytischer Einsatz mit mehreren Reaktionszyklen war jedoch nicht möglich.



1.5.2 Dieisendiazonenkomplex

Eine schrittweise Reduktion von end-on koordiniertem Distickstoff über Diazenido- und Hydrazido-Zwischenstufen wurde von *D. Sellmann et al.*^{[28][29][25][26][30][31]} vorgeschlagen. Sie synthetisierten aus einem Hydrazido-Eisen-Komplex durch Oxidation des Hydrazidoliganden einen Dieisendiazonen-Komplex mit zwei fünfzähligen [NS₄]-Liganden und charakterisierten ihn röntgenstrukturanalytisch. Dabei wird das trans-Diazon durch zwei Eisen-Schwefel Fragmente und spezifische NH-S-Wasserstoffbindungen stabilisiert.

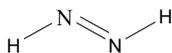


Abbildung 7 Diazen

Diazen gilt als mögliche Zwischenstufe im Stickstofffixierungsprozess. Auch *D. Coucouvanis et al.* berichteten über Strukturanaloga für die MoFe₃S₃ Untereinheit des Nitrogenase-Cofactors und diskutierten die Insertion von Distickstoff in eine Fe-Fe-Bindung^[32].

In diesem Zusammenhang sei auch auf den Artikel von *M. Reiher et al.*^[33] verwiesen, die mit theoretischen Methoden zeigen konnten, dass Wasserstoff-Brückenbindungen eine wichtige Rolle bei der Stabilisierung von Diazonenkomplexen als Modell für die Nitrogenaseaktivität spielen könnten.

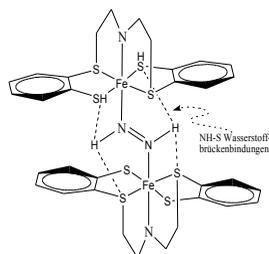


Abbildung 6 Stabilisierung von trans-Diazen durch zwei Eisen-Schwefel Fragmente und spezifische NH-S-Wasserstoffbindungen [21]

1.5.3 Stickstofffixierungsmodell von Yandulov und Schrock et al.

Schrock *et al.*^[21] entwickelten 1993 einen Vorschlag für einen katalytischen Stickstoffassimilationszyklus. Die Koordination des Stickstoffs erfolgt am Molybdän- oder Wolframzentrum, das sich in hoher, formaler Oxidationsstufe befindet (s. Abbildung 8). Ein in diesem Vorschlag wesentlicher Unterschied zum *Chatt-Zyklus* (Abbildung 5) ist die Ausbildung einer intermediären η^2 -Hydrazin-Bindung vor der N-N-Bindungsspaltung. Hiermit wird die Bildung eines sehr stabilen Metall-Nitrid-Intermediates und die damit verbundene Erhöhung der Oxidationszahl des Metalls um drei, was den Zyklus zum Erliegen bringen würde, verhindert.

Die aktuellste Arbeit zu den Stickstofffixierungsmodellen wurde von *Yandulov et al.* vor einigen Monaten vorgelegt^[34]: Sie stellten einen vollständigen Katalyse-Zyklus vor, der bis zu vier mal durchlaufen werden kann. Jede Zwischenstufe konnte unter nicht-katalytischen Bedingungen hergestellt und voll charakterisiert werden (Abbildung 9). Hierbei wird Distickstoff an einer sterisch abgeschirmten Koordinationsstelle an einem Molybdän-Zentrum reduziert. Die formalen Oxidationsstufen des Molybdäns wechseln im Zyklus zwischen Mo(III) bis Mo(VI).

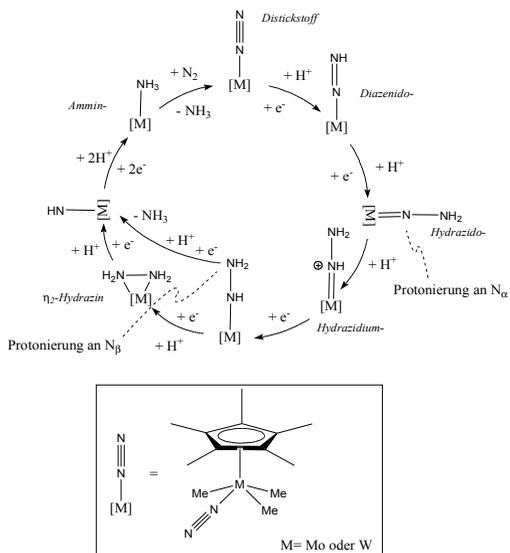


Abbildung 8 Schrock-Zyklus: Distickstoffreduktion an Mo oder W Metallzentrum mit hoher Oxidationsstufe^[21]

1.5.4 Weitere Distickstoffkomplexe

Arbeiten von *M. Hidai et al.* berichten über die NH_3 -Bildung durch eine Ru(II)-vermittelte Protonierung von Distickstoff, der an Komplexen des lange bekannten Typus $[\text{W}(\text{N}_2)_2\text{P}_4]$ koordiniert ist^[35]. Ebenso können auch zweikernige Hydrogensulfido-verbrückte Ir(III)- bzw. Fe(II)-Komplexe als Protonenquelle dienen^[36]. *C. C. Cummins et al.* wählen einen anderen Weg und verwenden Trisamido-Komplexe von Molybdän $\text{Mo}[\text{N}(\text{R})\text{Ar}]_3$, die das Distickstoffmolekül spalten, zu Nitrido-Komplexen werden und bei Hydrolyse Ammoniak bilden^[37]. *M. D. Fryzuk et al.*^[38] zeigten, dass Komplexe mit side-on gebundenem Distickstoff mit molekularem Wasserstoff unter Spaltung der Stickstoff-Stickstoff-Bindung reagieren und dann den koordinierten NH_2 -Liganden enthalten. Diese Auswahl an Reaktionen, bei denen zwar metallvermittelt Distickstoff aktiviert wird, verdeutlicht aber, daß diese Umsetzungen ganz im Gegensatz zur biologischen N_2 -Fixierung in nicht-wässrigen Lösungsmitteln verlaufen; zudem weisen die Metallkomplexe meist "unnatürliche" Liganden auf.

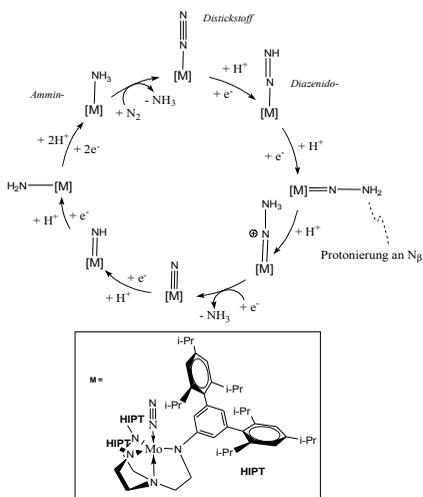


Abbildung 9 neuer Schrock-Zyklus [34]

Interessant in Hinblick auf die Belichtungsversuche, die in Abschnitt 2.4 beschrieben werden, sind die Publikationen von *O. Rusina et al.*^[39]. Dort wird die Photofixierung des Stickstoffes an nanostrukturierten Eisentitanatfilmen entsprechend einer Sonnenlicht-induzierten, nichtenzymatischen Stickstoff-Fixierung beschrieben.

1.6 Nitrogenase-Modelle im wässrigem Milieu

Nur einige wenige Experimente zur Aktivierung von Distickstoff in wässriger Lösung sind bisher bekannt:

M.A.A. Schoonen et al.^[40] berichten nach uns^[41] und von uns unabhängig über ähnliche Arbeiten zur Aktivierung von molekularem Stickstoff an Eisensulfid. Im Gegensatz zu unseren Experimenten wurde bei 25-30 bar Stickstoffdruck und $T = 120^\circ\text{C}$ gearbeitet. Auch Isotopenmarkierungs-Experimente, die in unseren Untersuchungen eine zentrale Position einnehmen und von großer Bedeutung sind, wurden nicht durchgeführt.

G. N. Schrauzer et al.^[42] behandelten die katalytische Reduktion von Distickstoff durch Molybdän(V)-Cystein-Komplexe.

Beachtenswerte Untersuchungen auf dem Gebiet der Fixierung von molekularem Stickstoff an Modellverbindungen wurden von *A. E. Shilov et al.*^[22] gemacht: wässrige Lösungen von Mo(III)-, Ti(II)- V(II)-, Mn(II)- und Ta(III)-hydroxiden sind in der Lage, N₂ bei Drücken um 10⁷ Pa zu reduzieren. Nennenswerte Ausbeuten konnten auch mit Mischungen aus V(II)- und Mg(II)-hydroxiden erzielt werden. Eisenhydroxide reduzierten jedoch unter den von *A. E. Shilov et al.*^[22] gewählten Bedingungen N₂ nicht. Die Gruppe um *A. E. Shilov* wählte für die Modellierung der N₂-Fixierung Vanadium (II)-Komplexe, die Catechol-Liganden enthalten^[22]. Weiterhin wird von *N. N. Rao et al.* berichtet, dass an Halbleitern wie TiO₂ unter Bestrahlung mit UV-Licht Stickstoff zu Ammoniak in wässrigem Milieu reduziert werden kann^[43].

J. A. Brandes et al.^[44] berichten über die Reduktion von elementarem Stickstoff an mineralischen Eisenoxiden bei hohen Temperaturen zwischen 300 und 800 °C und hohen Drücken zwischen 0.1 bis 0.4 GPa in Goldkapseln. Der molekulare Wasserstoff, der für die Reaktion benötigt wird, stammt aus Wasser. Sie verwendeten ein System aus Magnetit und Ameisensäure bzw. elementares Eisen als Reduktionsmittel. Diese Reaktion mit den beschriebenen Reaktionsbedingungen könnte nach Ansicht von *J. A. Brandes et al.* auf der Ureerde abgelaufen sein.

1.7 Vorstellungen zum Mechanismus der Stickstoffreduktion

Wie nun die Reduktion im aktiven Zentrum der Nitrogenase abläuft, ist noch verhüllt, doch finden sich in der Literatur zwei wichtige Ansätze: es wird einerseits ein mononuklearer Komplex mit end-on gebundenem Stickstoff am koordinativ gesättigten Mo diskutiert (*Smith et al.* und *Schrock et al.* e.g.)^{[45][34]}, andererseits bieten die koordinativ ungesättigten Fe-Atome der beiden FeS-Kuben z.B. in einem dinuklearen Komplex (*D. Sellmann et al.*)^[28] Bindungsmöglichkeiten für den Stickstoff. Bevor nun die beiden Ansätze etwas näher vorgestellt werden, hier noch zum Vergleich ein kurzer Exkurs in die technische Stickstofffixierung, da dieser Prozeß weit besser untersucht ist als der natürliche (in wie weit es zwischen der technischen und natürlichen Variante Parallelen gibt, müssen zukünftige Untersuchungen zeigen).

1.7.1 Haber-Bosch-Verfahren

Molekularer Stickstoff ist ein außerordentlich stabiles und wenig reaktives Gas, das chemisch nur unter bestimmten Bedingungen aktiviert werden kann. Die vielleicht berühmteste Reaktion neben der biologischen Fixierung ist der technisch überaus wichtige *Haber-Bosch-Prozess*^[46], durch den Millionen von Tonnen an Ammoniak pro Jahr produziert werden. Die diesem Prozeß zu Grunde liegende Gleichung (3) zeigt, daß der exotherme Prozeß auch exergonisch ist:

Da die in dieser Arbeit beschriebene Ammoniaksynthese wahrscheinlich keine Ähnlichkeit mit dem Haber-Bosch-Prozess hat und auch kein Konkurrenzverfahren zu diesem Prozess darstellen soll, wird auf eine tiefergehende Diskussion der Prozessabläufe verzichtet. Dieses energieintensive Verfahren - es werden mehr als 1 % des Gesamtenergieverbrauchs der Welt dafür aufgewendet^[47] - arbeitet bei hohen Temperaturen (> 500°C) und hohem Druck (~ 200 bar) in Anwesenheit eines Eisenkatalysators. Bisher konnten nur in einem abgewandelten Prozess, dem *Kellogg-Prozess*, mit einem Ruthenium-auf-Graphit-Katalysator die Reaktionsbedingungen auf



75 - 105 bar und 350 - 470 °C herabgesenkt werden^[48]. Die Reaktion erfolgt unter Chemisorption des H₂ und N₂ und unter Bildung eines Oberflächennitrids. Durch diese Aktivierung des H₂ / N₂ an der Katalysatoroberfläche folgt ein schnellerer, stufenweiser Aufbau des N₂ zum NH₃^[49].

Für die vorliegende Arbeit, die an die Reaktionen der Nitrogenase anknüpft, sind die in der Literatur entwickelten Vorstellungen zu einem Mechanismus bei

stickstofffixierenden Enzymen wichtiger. Ansätze zur Modellierung eines Mechanismus der Nitrogenase soll die folgende Auswahl vermitteln. Sie kann für die Entwicklung eines möglichen Reaktionsmechanismus bei der Aktivierung und Reduktion von molekularem Stickstoff an Eisensulfid-Oberflächen wichtige Anregungen geben.

1.7.2 Mononuklearer Stickstoffkomplex am Mo

1992, also vierundzwanzig Jahre nach dem Stickstofffixierungsmodell von *Chatt et al.*, überträgt *Smith et al.* [22] eine leicht modifizierte Fassung dieses Vorschlages auf das mögliche aktive Zentrum im FeMo-Cofaktor der Nitrogenase (s. Abbildung 10): Eine Besonderheit stellen die letzten Schritte im Zyklus dar, die eine Freisetzung von Wasserstoff erklären. Auch *Yandulov et al.* legen, analog ihrem synthetischen Modell (vgl. 1.5.3), eine primäre end-on Koordination des Distickstoffs nahe^[34].

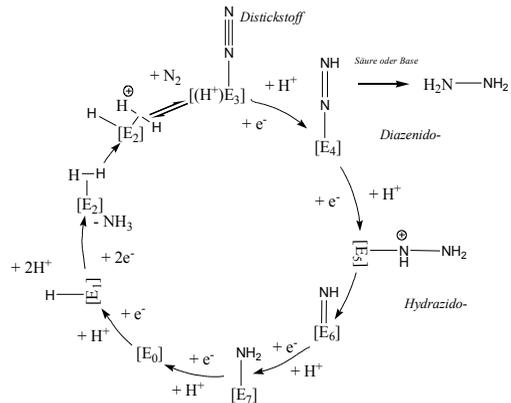


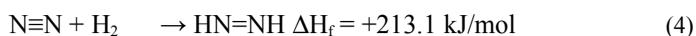
Abbildung 10 Katalytischer Zyklus der Reduktion von Distickstoff durch Mo-Nitrogenase (von *Klebsiella pneumoniae*); in ihr ist vor der Bindung des Stickstoffs Wasserstoff im aktiven Zentrum koordiniert. E_0 = Ausgangszustand des MoFe-Proteins. [22]

1.7.3 Dinukleare Distickstoffkomplexe am Fe

Im Gegensatz dazu sehen die Modellvorstellungen von *D. Sellmann et al.* wie folgt aus: Für die Autoren ist der wahrscheinlichere Ort der primären Stickstoffkoordination das Zentrum der beiden FeS-Kuben im FeMo-Cofaktor. Gemäß dem Dieisen-diazidenkomplex (Abbildung 6) koordiniert Stickstoff in einem dinuklearen Komplex. Dies steht in Einklang mit der Existenz eines Nur-Fe-Cofaktors und den neuesten Berechnungen von *Einsle et al.*, die ja im Zentrum des FeMo-Cofaktors möglicherweise Stickstoff vermuten^[5].

1.8 Thermodynamische und kinetische Betrachtungen zur Stickstoffreduktion

Die hier vorgestellten, wichtigen thermodynamischen und kinetischen Aspekte, sollen die Randbedingungen der Ammoniakbildungsreaktion verdeutlichen und den gehemmten Ablauf der Reduktion erklären. Obwohl die Einzel-, Doppel- und Dreifachbindungsenergien des Stickstoffs ähnlich der bei Kohlenstoff sind⁹ ($E(N\equiv N) \approx 942$ KJ/mol; $E(N=N) \approx 418,7$ KJ/mol; $E(N-N) \approx 163,3$ KJ/mol), ist es weitaus schwieriger, Stickstoff zu aktivieren: dies spiegelt die hohe Standardbildungsenthalpie der Reaktion (4) wider.



(ΔH_f : Standardbildungsenthalpie_{formation})s. [20]

Aus den Reaktionsgleichungen (4)-(6) ist ersichtlich, dass die energetische Barriere bei der Reduktion des Stickstoffs die Dreifachbindung darstellt. Darin ist der Grund für die Stabilität des Stickstoffs zu finden. Diese Eigenschaft unterscheidet Stickstoff von vielen anderen Molekülen mit Dreifachbindung - so ist z.B. im Ethin (mit einer ähnlichen Bindungsenergie der Dreifachbindung 963 KJ/mol) nur 220 KJ/mol zur Spaltung der ersten Bindung notwendig. Die folgende Reduktion der HN=NH-Doppel- (5) und H₂N-NH₂-Einfachbindung (6) ist sogar energetisch begünstigt.

Sowohl die hohe Aktivierungsenergie für die Spaltung des Stickstoffmoleküls wie auch die hohe Bindungsenergie der Stickstoffdreifachbindung (942 KJ/mol) sind für die hohe Stabilität des Distickstoffmoleküls verantwortlich. Um eine entscheidende Erhöhung der Umsetzung des Stickstoffs zum Ammoniak herbeizuführen, ist die Suche eines geeigneten Katalysators, der die hohe Aktivierungsenergie herabsetzt, notwendig. Vorbild können die natürlichen Katalysatoren (=Enzyme) sein, welche die Stickstofffixierung bei Umgebungstemperatur ablaufen lassen.

1.9 Eigenschaften des Eisensulfides

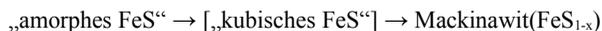
Die Erfahrungen aus unseren Experimenten haben gezeigt, dass es für die Stickstoffreduktion wichtig ist, in welcher Form die Eisensulfidteilchen vorliegen: so

9 $E(C-C$ Einfachbindung) $\approx 347,5$ KJ/mol ; $E(C=C$ -Doppelbindung) $\approx 611,3$ KJ/mol und $E(C\equiv C$ -Dreifachbindung) $\approx 837,4$ KJ/mol

waren z.B. gealterte Eisensulfide nicht reaktiv. Warum konnte das beobachtet werden? Eisensulfide haben, besonders nach frischer Fällung, keine definierte Stöchiometrie; es entstehen zunächst wohl metastabile Verbindungen unterschiedlichster Zusammensetzung^{[50][51][52]}. Diese Metastabilität ist mit für die besondere Reaktivität verantwortlich. Um diese Reaktivität des Eisensulfides zu verstehen, sollen hier wichtige Eigenschaften aus der Literatur zusammengefasst werden.

Frisches, feuchtes „FeS“ oxidiert an der Luft rasch. In der Literatur wird berichtet, dass diese Reaktion so heftig sein kann, dass die stattfindende Selbsterwärmung zur Selbstentzündung führen könne¹⁰. Lösungen von frisch gefälltem Eisensulfid färben sich bei Sauerstoffzutritt nach kurzer Zeit braun.

Die Stöchiometrie der entstehenden Sulfide ist u.a. von der Temperatur, dem pH-Wert der Lösung und der sulfidischen Spezies abhängig. Direkt bei der Fällung entsteht zunächst „amorphes FeS“, was auch in Pulverdiffraktogrammen gefunden werden konnte (s. Abbildung 25). Die Entstehung der verschiedenen Eisensulfidphasen in wässrigen, anaeroben Systemen wurde in den Arbeiten von *M. A. A. Schoonen et al.* ausgiebig behandelt, danach wandelt sich „amorphes FeS“ (Fe_{1.11}S-Fe_{1.09}S) bei pH ≈ 6 schrittweise über eine kurzlebige, kubische Zwischenstufe (Fe_{1.03}S-Fe_{1.1}S) in Mackinawit (FeS_{0.93}-FeS_{0.96}) um^{[50][51]}:



Ist Sauerstoff vorhanden, bildet sich auch Greigit (Fe₃S₄). Von Mackinawit und Greigit gibt es Reaktionswege zum Pyrit. Die Kinetik der Bildung von Pyrit aus Eisensulfid wurde von *Rickard et al.* untersucht^[53]. Die Pyritbildung nach folgender Reaktion



besitzt eine freie Reaktionsenthalpie von -34.14 KJ/mol und ist deshalb thermodynamisch begünstigt.

1.10 Eisensulfid Mikro- und Nanopartikel

Um Mechanismen von Reaktionen zu untersuchen, die an der Oberfläche ablaufen, sollten Eisensulfidteilchen mit einer definierteren Größe und damit auch Oberfläche hergestellt werden. So gilt allgemein: je kleiner ein Teilchen, desto größer ist sein Volumen zu Oberflächenverhältnis. Das heißt mit anderen Worten, die gleiche Masse Teilchen eines Stoffes hat bei kleinerem Teilchendurchmesser eine größere Oberfläche. Da es sich bei der vorgestellten Reaktion (1) um eine Dreiphasenreaktion handelt (fest-

¹⁰ Gmelin, Bd. 59(Fe [B]), S. 355ff., und [51]

flüssig-gasförmig), sollte der Oberfläche der Eisensulfidteilchen eine besondere Bedeutung zukommen: Es wird angenommen, dass durch die Vergrößerung der Partikeloberfläche die Aktivität der Eisensulfide gesteigert wird.

Zur Herstellung kleiner Partikel gibt es verschiedene Ansätze: Es kann versucht werden, Eisensulfid in Anwesenheit eines amphiphilen Moleküls (z.B. 10-Mercapto-1-decansulfonsäure) herzustellen. Das Amphiphil könnte unter Bildung supramolekularer Strukturen die Form der Eisensulfid-Partikel beeinflussen. Ein weiterer Weg ist die Prädetermination des entstehenden Teilchens durch ein Templat. Als Template können inverse Micellen fungieren. Eine vielversprechende Methode, Metallsulfidnanopartikel in inversen Micellen herzustellen, wurde bereits vor mehr als 15 Jahren erfolgreich bei der Bildung von CdS-Nanopartikeln angewandt^{[54][55][56][57][58][59]}.

Mein Interesse liegt nun darin, nach dieser Methode FeS-Nanopartikel zu erzeugen, die als Reduktionsmittel in weiteren Reaktionen Verwendung finden sollen. Nach den Methoden von *P. Lianos et al.*^{[54][55]}, *C. Petit et al.*^[36] und *M.P. Pileni et al.*^{[57][58]} wurden wässrige Lösungen der entsprechenden Reaktionspartner als Wasser-in-Öl-Mikroemulsionen bereitet. Diese Mikroemulsionen werden als „inverse Micellen“ bezeichnet¹¹ und durch Detergenzien wie z.B. *Bis(2-ethylhexyl)sulfosuccinat-Natriumsalz* (=Dihexylnatriumsuccinat, *AOT*) stabilisiert. Leitet man in die metallsalzhaltige Wasser-in-Öl-Mikroemulsion Schwefelwasserstoff, so bildet sich augenblicklich eine kolloidale Suspensionen, die Metallsulfidpartikel, umschlossen von *AOT*, enthält (vgl. Skizze Abbildung 12). Der Durchmesser dieser Metallsulfidteilchen wird durch das innere Volumen der inversen Micellen bestimmt.

Es wird vermutet, dass der Stoffaustausch der Reaktanden über die Kollision der inversen Micellen geschieht und das Detergenz das weitere Anwachsen der Teilchen verhindert^[60]. Die so erzeugten, hochdispersen Teilchen bleiben in der Suspension über mehrere Monate stabil.

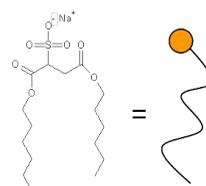


Abbildung 11 Bis(2-ethylhexyl)sulfosuccinat-Natriumsalz = Dihexylnatriumsuccinat (*AOT*)

¹¹ Wichtig für die Herstellung von inversen Mizellen ist die Berücksichtigung des Phasendiagramms des Systems. [Rosen, M. J. *Surfactants and Interfacial Phenomena*; Wiley: New York, 1989] hat Wasser in Öl Systeme mit *AOT* genauer untersucht.

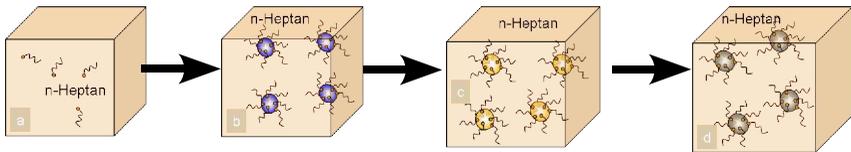


Abbildung 12 Skizze zur Entstehung der Nanopartikel: (a) n-Heptan mit AOT; (b) Zusatz von Wasser → inverse Micellen; (c) Zusatz von Fe^{2+} -Salz; (d) H_2S Einleitung → FeS Nanopartikel

Als mögliches Anwendungsgebiet kann frisch gefälltes Eisensulfid als kostengünstiges, Rohstoff-schonendes Reduktionsmittel eingesetzt werden, z.B. um unter anaeroben Bedingungen aliphatische Halogenkohlenwasserstoffe teilweise zu dehalogenieren^[61]. Besonderes Interesse besteht seit einiger Zeit an der Herstellung von Fe_2S_3 - und FeS_2 -Nanopartikeln, um diese im Kohleverflüssigungsprozess einzusetzen^{[62][63]}, und an der Synthese von mesostrukturiertem Eisensulfid^[64].

Nachdem die Ausgangspunkte der vorliegenden Arbeit skizziert wurden soll nun die eigentlich Aufgabenstellung formuliert werden:

1.11 Ausgangsfragestellung

Am Ende der Einleitung sei hier die Kernfragestellung der vorliegenden Arbeit, um sie deutlich hervorzuheben, noch einmal genannt. Frisch gefälltes Eisensulfid mit seiner vermutlich großen „Bibliothek“ an unterschiedlichen FeS-Clustern und die in den Fe-only-Nitrogenase-Enzymen essentiellen FeS-Cluster könnten teilweise in einer strukturell verwandtschaftlichen Beziehung stehen.

Die gewählten Reaktionsbedingungen - Stickstoffdruck, Temperatur und Medium - folgen in direkter Weise aus der in der gesamten Einleitung vorgestellten präbiotischen Umgebung und den Existenzbedingungen der Nitrogenasen:

Es soll hier untersucht werden, ob ein wässriges System mit frisch gefälltem Eisensulfid unter annähernd physiologischen Bedingungen in der Lage ist in einer modellhaften Reaktion *Distickstoff* zu reduzieren und in *Ammoniak* zu überführen.

2 Methoden und Experimentelles

Eine Trennung zwischen *Methoden* und *Ergebnissen* wirkt in meiner Darstellung etwas künstlich, da die meisten verwendeten Methoden keine „Standardlabormethoden“ sind, sondern erst für die spezielle Fragestellung entwickelt oder angepasst werden mussten. So stellt eine erfolgreiche Anpassung oder Entwicklung einer *Methode* ein wichtiges *Ergebnis* auf dem Weg der Beantwortung der Ausgangsfragestellung (1.11) dar. Eine kunstgerechte Trennung in eine Darstellung der „experimentellen Methoden“ und in „Ergebnisse“, die die Ausgangsfragestellung unmittelbar betreffen, wurde dennoch versucht, um eine dem Leser besser überschaubare Gliederung vornehmen zu können.

Der Beschreibung der experimentellen Details möchte ich zunächst eine Reihe grundsätzlicher Überlegungen voranstellen.

2.1 Experimentierstrategie

Aus einer langen Reihe von Vorexperimenten aus denen sich neue Fragen ergaben, hat sich die gegenwärtige Methode der hier beschriebenen Stickstofffixierung entwickelt. Da geringe Ausbeuten an Ammoniak zu erwarten waren, wurden die Experimente gleich zu Beginn im „*pilot-plant*“-Maßstab¹² mit drei Mol Eisensulfid geplant. Auch die Versuchsdauer von jeweils 4 - 8 Wochen ergab sich aus ersten Versuchen und Abschätzungen der Ausbeute bzw. Bestimmungen der Ammoniakkonzentration. Viele Ergebnisse aus diesen Vorversuchen und den daraus resultierenden Fragestellungen flossen in die weitere Entwicklung der für das Experiment notwendigen Apparatur ein: so mußten externe Ammoniakquellen weitestgehend ausgeschlossen werden, die Dichtigkeit der Apparatur auch in Hinblick auf Eindringen von Sauerstoff optimiert, und Metallteile, die potenziell katalytisch aktiv sein konnten, aus der Anlage entfernt werden. Um die Reproduzierbarkeit der Reaktionsbedingungen zu ermöglichen wurde eine Prozessüberwachung und -automation eingerichtet und programmiert. Auch die Methode zur möglichst verlustfreien Isolierung und Analytik des gewonnenen Ammoniaks bedurfte einer Optimierung.

Da bei der untersuchten Reaktion eine gasförmige Phase beteiligt ist, sollte die Ausbeute an Ammoniak eine Druckabhängigkeit zeigen. Die Prozeßführung bei höheren Drücken erwies sich jedoch bei allen von uns durchgeführten Experimenten als außerordentlich problematisch und scheiterte schließlich an deren Reproduzierbarkeit.

¹² pilot-plant = (engl.) Pilot-Anlage; Bezeichnung aus dem Anlagenbau für eine Anlage bestimmter Größe

Ein Schwerpunkt unserer Arbeiten lag auf der Optimierung der *pilot-plant*-Versuche bezüglich der Reinheit der Edukte, Stabilität der Versuchsbedingungen und einer ausgeklügelten Probennahme für die Versuche mit Luftstickstoff, der mit $^{15}\text{N}_2$ angereichert wurde. Diese Vorgehensweise wird später im Einzelnen beschrieben.

Ein weiterer Schwerpunkt lag in der Untersuchung des Einflusses der Reaktionsparameter auf die Gesamtreaktion, wie Teilchengröße und Zusammensetzung des Eisensulfides, sowie der Temperatur und des Gasdurchflusses.

Für eine gesicherte Versuchsdurchführung waren eine ganze Reihe von Überlegungen und Methoden notwendig.

Methodisches Vorgehen

● **Ausschluß von Verunreinigungen**

Analyse der Quellen von Verunreinigungen an Ammoniak und Entwicklung von Methoden zur Reduzierung möglicher Kontaminationen.

● **NH₃-Analytik**

Entwicklung einer schnellen, einfach anwendbaren Isolierungs- und Nachweismethode zur präzisen Abschätzung der gebildeten Ammoniakmenge.

● **Isotopenmarkierungsexperimente**

Entwicklung eines sicheren Nachweises für die Entstehung von Ammoniak aus molekularem Stickstoff.

● **Probenvorbereitung für die Isotopenverhältnismassenspektrometrie**

Entwicklung und Vorbereitung der bei der Umsetzung von isotopenangereichertem Stickstoff zu Ammoniak gewonnenen Proben, mit dem Ziel, zum einen die Verluste an „kostbarem“ Produkt - isotopenangereicherter Ammoniak - zu minimieren und zum anderen das Isotopenverhältnis nicht zu verändern:

● **Synthese von Li₃N zur Bestimmung des Stickstoffisotopen-Verhältnisses**

Die Zusammensetzung des mit ^{15}N -Isotop angereicherten, molekularen Stickstoffs war massenspektrometrisch schwer nachweisbar. Leichter wurde diese durch die quantitative Reaktion von Li mit der $^{15}\text{N}_2$ /Luftstickstoff-Gasmischung messbar.

● **Abschätzung der Ammoniak-Quellen**

Ammoniak und Stickstoffverbindungen sind in Spuren ubiquitär. Eine Abschätzung der unerwünschten, externen NH_3 -Quellen war für die Bestimmung des Bildwertes notwendig.

Apparative Methoden

● Aufbau der Apparatur/Reaktor

Die Reaktion erfordert besondere Randbedingungen: leichter Überdruck, Glasverbindungen, Gaswäsche, Dichtigkeit; dazu bedurfte es der Entwicklung einer geeigneten Apparatur.

● Prozesssteuerung

Der Reaktor sollte über mehrere Wochen unter konstanten Bedingungen laufen; ein Prozesssteuerungssystem machte das möglich. Dies mußte entwickelt werden.

● Präzisionsfällung

Die Oberfläche der Sulfidteilchen ist von entscheidender Bedeutung für die Ammoniakbildung. Mit einer Apparatur, die definierte, reproduzierbare Fällungen erlaubt, konnte die Gestalt und Größe der Eisensulfidoberfläche variiert werden.

● UV-Vis-Spektrometrie

UV-Vis-Spektrometrie wurde zur spurenanalytischen Bestimmung von (derivatisiertem) Ammoniak eingesetzt. Die Basis der Gehaltsbestimmung bildete der kommerziell erhältliche Test MERCK-Spekroquant®. Dieser Test mußte modifiziert werden, um die geringen Probenmengen bestimmen zu können.

● Isotopenverhältnis-Massenspektrometrie (IRMS-Methode)

Isotopenverhältnis-Massenspektrometrie (IRMS) ist in der Lage, kleinste Abweichungen im Isotopenverhältnis einer Probe zu einem Standard zu bestimmen. Sie wurde zur Überprüfung der durchgeführten Reaktion herangezogen.

● Röntgenpulverdiffraktometrie

Der erfolgreiche Ablauf der Reaktion kann nach Reaktionsgleichung (1) an der Bildung von Pyrit abgelesen werden. Hierzu war die Untersuchung der

hergestellten Eisensulfide mittels Röntgenpulverdiffraktometrie die Methode der Wahl.

- **Elektronenmikroskopie**

Zum Studium und zur Optimierung der Fällungsbedingungen des Eisensulfides sowie dessen Beschaffenheit der Oberfläche und Teilchengröße wurden die Rasterelektronenmikroskopie und die Transmissions-Elektronenmikroskopie eingesetzt.

- **Raman-Spektroskopie**

Auch die Raman-Spektroskopie gab deutliche Hinweise zum Reaktionsverlauf über die Bildung von Pyrit.

Nun sollen die aufgezählten Punkte konkretisiert und tiefergehend beschrieben werden.

2.2 Das Stickstofffixierungsexperiment

2.2.1 Aufbau der Stickstofffixierungsapparatur

Welche Anforderungen muß ein experimenteller Aufbau zur Stickstofffixierung im analytischen Spurenbereich gewährleisten ?

- Inerte Bedingungen (Argon- bzw. Stickstoff-Atmosphäre) über den gesamten Reaktionszeitraum,
- Ausgleich eines Druckwechsels in der Apparatur bei Änderung der Umgebungstemperatur und dadurch bedingte Undichtigkeiten,
- Reinheit der Gase (Inertgas, Stickstoff),
- Reinheit der Chemikalien (FeSO_4 , Na_2S , H_2O , H_2SO_4 , NaOH),
- definierte Zusammensetzung der FeS-Suspension,
- stabiler Betrieb der Anlage über lange Zeiträume (bis zu 8 Wochen).

Die gesamte Apparatur hat sich im Laufe der Zeit deutlich verändert und den Anforderungen der Experimente angepasst. Um die Dichtigkeit der Apparatur zu erhöhen und damit das Eindringen von Fremdstoffen zu verhindern, wurden in der ersten Ausbaustufe alle Verbindungen durch Glasrohre und Edelstahlrohre hergestellt. Des Weiteren wurden in die Anlage zwei Mass-Flow-Controller und eine Temperaturüberwachung des Reaktors integriert (entsprechende Steuersoftware wurde mit HP-Vee entwickelt).

In der zweiten Ausbaustufe lag das Hauptaugenmerk auf der Reinigung der Gase: Es mußten möglichst alle stickstoffhaltigen Verunreinigungen, die im Reaktor akkumuliert werden könnten, entfernt werden. Dazu wurden vier Reinigungsstufen installiert:

- (1) Gasreiniger der Firma Valco (4) – kommerzielles Gerät, welches aus N_2 der Reinheit 5.0 N_2 der Reinheit 6.0 machen soll.
- (2) oxidative Wäsche mit schwefelsaurer KMnO_4 (6) zur Oxidation von möglicherweise im Gas vorhandenen, oxidierbaren Stickstoffverbindungen wie N_2O zum NO_2 .
- (3) alkalische Wäsche mit KOH (7) zur Absorption von möglichem NO/NO_2 .

- (4) saure Wäsche mit H_2SO_4 (8) zum Ausschluß von möglichem NH_3 im Ausgangsgas.

Schließlich konnten durch Verwendung von Dosierpumpen (pH-Wert, Suspensionszusammensetzung) und die Messung mit einer pH-Elektrode die Umsetzungen kontrolliert durchgeführt werden. Eine definierte Sulfidfällung, online pH-Wert-Messungen und automatische pH-Wert-Regelung waren so möglich. Begleitend wurde eine umfangreiche Steuersoftware entwickelt (vgl. Kapitel 2.2.2).

Den Aufbau der gegenwärtigen Apparatur zeigt Abbildung 13

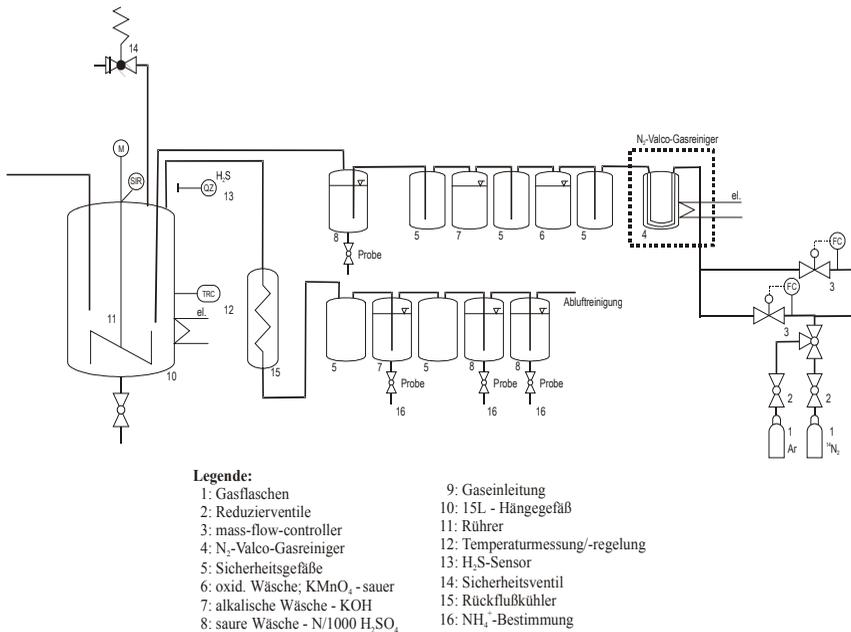


Abbildung 13 Schematischer Aufbau der Stickstofffixierungsapparatur

2.2.2 Prozesssteuerung

Zur Steuerung der Anlage wurde ein HP(Agilent)-Vee-Programm geschrieben. Im Appendix (9.4) befindet eine genauere Beschreibung der einzelnen Module, sowie deren Handhabung¹³.

¹³ Auf die beiliegende CD-ROM ist ein Demonstrationsprogramm der Software und die voll lauffähige Version gebrannt. Beide Varianten sollten auf allen Rechnern laufen, für die es HP-Vee (Version ≥ 5.0) gibt. Die voll lauffähige Version kann nur auf einem Rechner mit der zu Beginn von Appendix 9.4 genannten Hardwarekonfiguration ausgeführt werden.

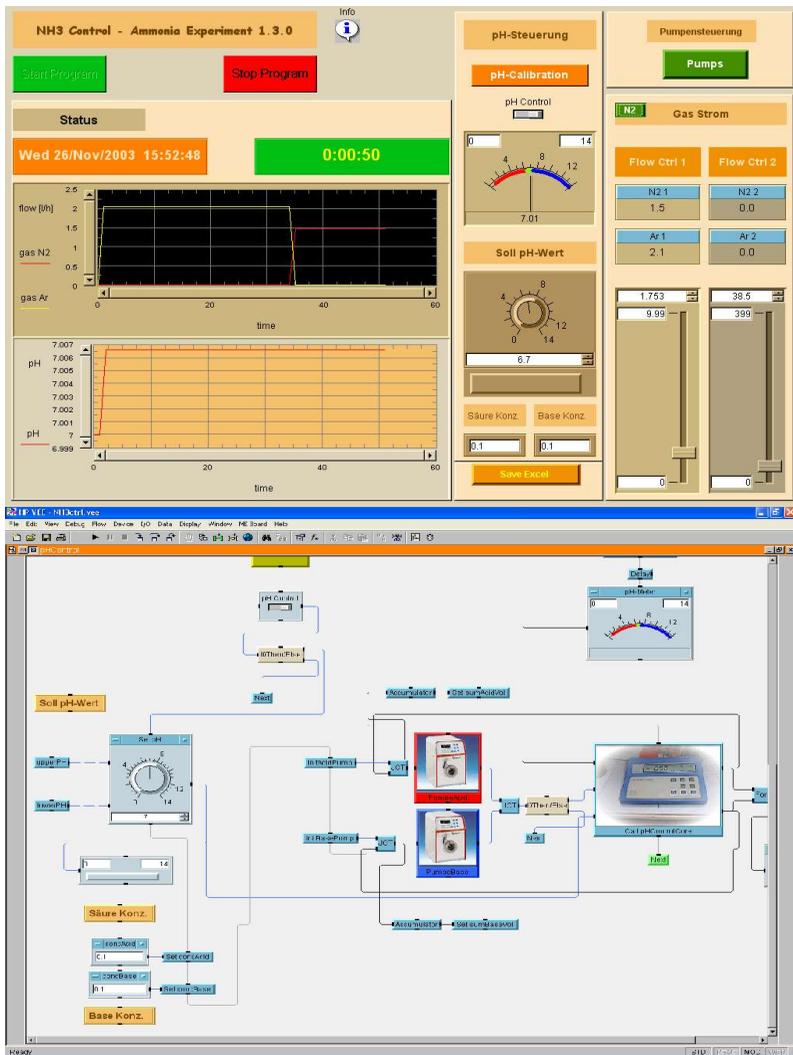


Abbildung 14 Hauptsteuerfenster des Programms und Teil des Programms in graphischer Programmiersprache HP-VEE

- Schnelle Implementierung von Steuersoftware mit graphischer Programmieroberfläche, da komplexe Funktionen und Funktionalität schon im Sprachumfang enthalten sind;
- überschaubare Programmstrukturierung für kleine und mittelgroße Programmprojekte,
- geringe Hardwareanforderungen, trotz guter Gesamtperformance,
- gute, leicht anwendbare Unterstützung der verwendeten Meilhaus-Steuerkarten durch mitgelieferte Treiber, Programmmodule und Spezialisierung auf Steuerungsaufgaben,
- neben LabView[®] hat sich diese Software als Industriestandard etabliert

Das Programm ist vollständig modular aufgebaut und beinhaltet, wie (Abbildung 14) zeigt, vier Module:

1. Gasflusssteuerung
2. Pumpensteuerung
3. pH-Wert-Steuerung
4. Prozessdokumentation

Diese vier Module haben folgende Funktionen:

2.2.2.1 Gasflusssteuerung

Ansteuerung der zwei Flow-Controller zur definierten Dosierung des Inertgases bzw. Stickstoffs. Gasströme von 0,5 l/min bis 400 l/min können eingestellt werden. Auf dem Hauptfenster der Prozesssteuerungssoftware „NH3Ctrl“ kann dann der aktuelle Gastyp und der aktuelle Gasfluß sowie der zeitliche Verlauf abgelesen werden. Die Gasflußdaten werden regelmäßig dem Prozessdokumentationsmodul übergeben.

2.2.2.2 Pumpensteuerung - definierte Sulfidfällung

Das Pumpensteuerungsmodul ermöglicht die unabhängige Ansteuerung zweier Schlauchpumpen¹⁵ mittels serieller RS-232-Schnittstelle. Die Parametrisierung der Pumpen wurde modular gehalten und erlaubt damit eine vom Pumpentyp weitestgehend unabhängige Kontrolle. Es können mit Schlauchpumpen vom Typ Ismatec IP65 Volumenschritte bis unter 100 µl dosiert werden. Dieses Modul erlaubt die Herstellung genau definierter Sulfidsuspensionen, was für die Reproduktion und Variation der Fällungsbedingungen notwendig ist. Die Gesamtmenge an geförderter

¹⁵ z.B. vom Typ Ismatec IP65

Lösung wird dem Dokumentationsmodul mitgeteilt, so daß auch im Nachhinein eine Kontrolle der zugesetzten Lösungen möglich ist.

2.2.2.3 pH-Wert-Steuerung

Die Konstanz des pH-Wertes ist für die Reaktion wichtig und wird mit Hilfe einer speziellen, elektrolytfreien pH-Elektrode (*Fa. Mettler-Toledo*), die Sulfid-unempfindlich ist und Temperaturen bis 80°C toleriert, einem pH-Meter (*Fa. Schott*), der *Meilhaus* A/D-D/A-Mess- und Steuerkarte (*ME-3000*) und dem pH-Steuerungsmodul der Software realisiert. Hierbei werden die Spannungsänderungen des pH-Meters als analoges Signal erfasst und mit Hilfe der A/D-D/A-Messkarte in digitale Steuersignale umgesetzt. Aus einer Zweipunkt pH-Kalibration, die die eingehende Spannung mit einem pH-Wert verknüpft, kann der aktuelle pH-Wert ermittelt werden. Eine in HP-Vee fertig implementierte PID-Regelung, welche für den konkreten Regelungsprozess optimiert werden kann, berechnet die Volumina zuzusetzender Säure bzw. Base für die zwei Schlauchpumpen. Hierbei werden die Konzentrationen der vorrätigen Säure bzw. Base im Programm berücksichtigt. Der pH-Wert wird in eingestellten Intervallen der Prozessdatenerfassung übermittelt.

2.2.2.4 Prozessdatenerfassung

Das vierte Modul erfasst nun die vielen anfallende Prozessdaten (Prozessdauer, Gasfluss, pH-Wert, Säurevolumen, Basenvolumen, FeSO_4 -Lösungsvolumen, Na_2S -Lösungsvolumen) und stellt diese sowohl in graphischer Form auf den Monitor des Prozesskontrollrechners als auch als Datei in tabellarischer Form mit Hilfe einer Schnittstelle zu einem Tabellenkalkulationsprogramm dar. Dies erlaubt, den genauen Verlauf der Reaktion zu verfolgen und die Reaktion zu dokumentieren.

2.2.3 Stickstofffixierungsexperiment im „pilot plant“ Maßstab

Für alle Versuche, die in der Apparatur Abbildung 13 durchgeführt wurden, gilt die folgende Syntheseanleitung:

Eine Lösung von 720 g (3 mol) $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9 \text{H}_2\text{O}$ in 4 l mit Argon gesättigtem dest. Wasser und eine Lösung von 834 g (3 mol) $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ in 3 l werden bei Raumtemperatur in einem 15 l Hängegefäß (10) vereinigt, dabei fällt tiefschwarzes Eisensulfid aus. Die so erhaltene wäßrige Suspension wird auf 80°C erwärmt. Im Anschluss wird der pH-Wert durch Zugabe 10 M NaOH-Lsg. von 6 auf $\text{pH} > 11$ eingestellt (etwa 40 ml) und das Gemisch vier bis acht Tage mit Argon gespült (Strömungsgeschwindigkeit ca. 14 l/h),

um das Ammoniak zu entfernen, der durch die Ausgangsstoffe eingeführt wurde. Der analytische Nachweis von eventuellen Verunreinigungen durch Ammoniak erfolgt täglich mittels des optischen MERCK-Tests (nach Berthelot-Reaktion, vgl. Kapitel 2.2.5.2, S.50) aus der Vorlage (N/1000 H₂SO₄). Danach wird durch tropfenweise Zugabe von etwa 80 ml eines 2:1 Gemisches aus conc. H₂SO₄/H₂O ein pH-Wert von 4 eingestellt. Durch die Reaktionsmischung wird im Zeitraum von 14 Tagen ein Stickstoffstrom von 5 l/h geleitet. Anschließend wird durch Zugabe von 10M NaOH-Lsg. im Argonstrom (14 l/h) der pH-Wert auf ca. 14 erhöht (etwa 150 ml). Innerhalb von 14 Tagen wird der entstandene Ammoniak im Argonstrom (10 - 14 l/h) aus der Apparatur ausgetrieben und in einer Vorlage, gefüllt mit N/1000 H₂SO₄, aufgefangen. Nach Beendigung des Versuches schließen sich analytische Untersuchungen gemäß 2.2.5 an, die Aussagen über die Menge des gebildeten Ammoniaks treffen.

2.2.4 ¹⁵N-Isotopenmarkierungsversuche im „pilot plant“ Maßstab

Die Versuche mit ¹⁵N-markiertem Stickstoff wurden analog 2.2.3 durchgeführt. Die einzige Änderung betrifft das Stickstoffgas: die mit ¹⁵N₂ angereicherte Gasmischung strömte mit 0,5 L/h durch die Suspension. Als Gasmischung wurde ein Isotopengemisch der Firma Linde AG eingesetzt, das 0,6 L ¹⁵N¹⁵N in 1200 L Luftstickstoff enthielt. Für die Auswertung der Ergebnisse der Isotopenmarkierungsexperimente ist zu beachten, dass die gelieferte Gasmischung, wegen produktionstechnischer Gegebenheiten, aus drei Spezies bestand, namentlich ¹⁴N¹⁴N, ¹⁴N¹⁵N und ¹⁵N¹⁵N; und dass die Mischung aus zwei Quellen hergestellt wurde: aus natürlich vorkommendem Luftstickstoff und seiner entsprechenden Isotopenverteilung mit einer Reinheit von 5.0 (= 0.00001 % Verunreinigungen) und dem zugesetztem ¹⁵N¹⁵N mit einer Reinheit von max. 95 % (= 5 % Verunreinigungen, u.a. in Spuren ¹⁴N¹⁴N, ¹⁴N¹⁵N). Der für unsere Experimente geeignetere ¹⁴N¹⁵N Stickstoff ist kommerziell nicht erhältlich und nur mit beträchtlichem apparativem Aufwand im Labor herstellbar.

2.2.5 NH₃-Analytik

2.2.5.1 Vorbereitung der Ammoniumproben

Empfindliche, quantitative Ammoniaknachweise werden in allen getesteten Methoden durch Fremdionen, wie S²⁻, SO₄²⁻ und Fe²⁺ gestört. So könnte (entstandenes) Ammoniak nur schwer und mit sehr großem apparativem Aufwand in der Eisensulfidsuspension im Reaktor nachgewiesen werden. Für die störungsfreie Durchführung der kommerziellen Farbtests und auch für die Isotopenverhältnis-Massenspektrometrie (IRMS) wird eine möglichst reine Ammoniumsalzlösung benötigt. Als in der Praxis hinreichend gut anwendbar hat sich das „alkalische Austreiben“ des Ammoniaks aus der Eisensulfidsuspension des Reaktors erwiesen. Hierbei wird der pH-Wert im Reaktor auf ca. 12-13 mit Kaliumhydroxid erhöht und Argon durch die Suspension geleitet. Das Ammonium-Ammoniak-Gleichgewicht verschiebt sich zum Ammoniak, welches durch den Ar-Gasstrom entfernt wird. Das Ammoniakgas kann dann in einer mit Schwefelsäure gefüllten Gaswaschflasche aufgefangen werden. Schwefelsäure wurde gewählt, da das resultierende Ammoniumsulfat thermisch sehr stabil ist, was wichtig für die anschließende destillative Eindampfung des Wassers ist. Verschiedene Ammoniumverbindungen wurden in einer Thermowaage einer Analyse unterzogen: hierbei erwies sich das Sulfat als die stabilste und am besten handhabbare Verbindung. Auch ist die Reaktion von Ammoniak mit verdünnter Schwefelsäure sehr schnell, so daß möglichst viel des durchgeleiteten Gases „gebunden“ werden kann. Als Konzentration der Schwefelsäurelösung für die Absorption des ausgetriebenen Ammoniaks wurde N/1000 mol/l gewählt. 100 ml N/1000 mol/l H₂SO₄ können ca. 18 mg/100 ml NH₃ aufnehmen, was die Obergrenze des verwendeten colorimetrischen Schnelltests darstellt. Zur Sicherheit wurde beim Austreiben des Ammoniaks noch eine weitere Waschflasche mit der gleichen H₂SO₄-Konzentration von N/1000 mol/l nachgeschaltet. Mit ihr kann überprüft werden, ob Ammoniak quantitativ aufgefangen wurde - konnte hier kein Ammoniak nachgewiesen werden, so mußte der weitaus größte Teil des Ammoniaks in der ersten Absorptionslösung aufgefangen worden sein.

2.2.5.2 Ammonium-Schnelltests

Auf der Suche nach einem schnellen und dennoch empfindlichen Ammoniaknachweis (< 1 mg NH₃/l) haben sich die kommerziell erhältlichen Ammoniumtests *MERCK Aquaquant*[®] und *MERCK Spectroquant*[®] bewährt. Die Tests basieren auf der Indophenolblaufreaktion (Berthelot's Reaktion; s. Appendix 9.1, Abbildung 28, S. 96): Mit einem Chlorierungsmittel wird im alkalischen Medium Hypochlorit erzeugt. Dieses reagiert bei pH = 13 mit Ammoniak zu Monochloramin. Unter dem Einfluss von

Dinatrium-pentacyano-nitrosylferrat entsteht aus Monochloramin und Thymol *N-Chlor-2-isopropyl-5-methylchinonmonoimin*, das sich mit einem weiteren Thymolmolekül zum entsprechenden *Indophenolblau* umsetzt.

Der *MERCK-Aquaquant*[®] Test ist ein semiquantitativer, optischer Schnelltest mit einer Farbvergleichstabelle. Er erlaubt eine schnelle Abschätzung der Ammoniumkonzentration (vgl. Abbildung 15). Sein Messbereich liegt zwischen 0,5 mg NH₄⁺/l bis ca. 10 mg NH₄⁺/l.

Eine genauere Quantifizierung der Ammoniumkonzentration ist mit dem spektroskopischen Test *MERCK-Spekroquant*[®] möglich. Der Hersteller gibt das Nachweisintervall mit 0,03 mg NH₄⁺/l bis 10 mg NH₄⁺/l an.

Beide Tests hatten den Nachteil eines großen Probenverbrauchs (minimal 5 ml Probelösung!). Bei der Überwachung der Ammoniakbildungsreaktion (1) über mehrere Wochen aus dem gleichen Absorptionsgefäß mit 100 ml Absorptionslösung wäre der Verlußt sehr groß (bei jeder Probe 5%). In Testreihen wurde deshalb versucht, den Probenansatz zu halbieren und die Zeitabhängigkeit der Reaktion bzw. deren Absorptionsverhalten zu überprüfen.

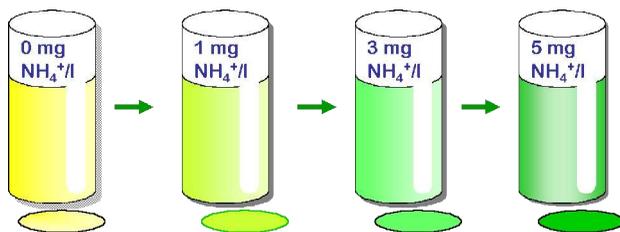


Abbildung 15 *MERCK-Aquaquant*-Farbschnelltest

Methoden:

Nach einer Kalibration mit der vom Hersteller empfohlenen Reagenzienmenge, wurde in vier Ansätzen die Gesamtansatzgröße (Probenmenge und Reagenzien) abgestuft ($\frac{3}{4}$, $\frac{2}{3}$, $\frac{1}{2}$, $\frac{1}{4}$) und mit Dreifachbestimmung überprüft, ob eine reproduzierbare, zuverlässige Messung erfolgen konnte. Die kleinste noch hinreichend genaue Ansatzgröße wurde für alle weiteren Messungen gewählt. Da die vielen Proben einer Meßreihe nicht alle zur gleichen Zeit vermessen werden konnten, mußte weiterhin überprüft werden, wie sich die Absorption von fertig hergestellten Analysenlösungen in Abhängigkeit der Zeit verhält. Dazu wurde eine Ansatzreihe mit Doppelbestimmung über ein Zeitintervall von 60 min alle 10 min untersucht.

Ergebnis:

Bei in etwa gleichbleibender Empfindlichkeit konnte die zu vermessende Probenmenge um die Hälfte reduziert werden. Alle Erfahrungen mündeten in der neuen Meßvorschrift:

Alle Proben werden unter gleichen Bedingungen wie folgt hergestellt¹⁶ -

- (1) 2 ml Probenlösung werden mit*
- (2) 240 µl der Reagenzes 1B versetzt und mit*
- (3) 59-60mg des Reagenzes 2B.*
- (4) Es folgt 5 min. Reaktionszeit.*
- (5) Danach Zusatz von 2 Tropfen Reagenz 3B*
- (6) 5 min Reaktionszeit*
- (7) Vermessung der Probe im UV-Vis Spektrometer bei $\lambda=690\text{nm}$.*

Zunächst wird eine Kalibrationskurve mit einer Verdünnungsreihe im zu bestimmenden Konzentrationsintervall aufgenommen. Anschließend erfolgt die zügige Konzentrationsbestimmung der eigentlichen Proben.

2.2.5.3 Enzymatischer Ammoniak-Test

Ein im Vergleich zu den Ammoniak-Schnelltests von *MERCK* (s. 2.2.5.2) empfindlicherer Test ist der von der *Firma Boehringer* angebotene enzymatische Ammoniaktest:

Der zu bestimmende Ammoniak setzt *2-Oxoglutarat* in Gegenwart von Glutamat-Dehydrogenase (GDH) und reduziertem Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid (NADH) zu *L-Glutamat* um, wobei NADH verbraucht wird. Die während der Reaktion verbrauchte NADH-Menge ist der Ammoniak-Menge äquivalent. Die Abnahme von NADH wird bei Wellenlängen von 334, 340 oder 365 nm verfolgt und kann nach Kalibration quantifiziert werden. Für die meisten Messungen ist eine Dreipunktkalibration ausreichend.

Der zeitliche Aufwand und die Kosten für diesen Test sind aber weitaus höher als bei den in Kapitel 2.2.5.2 beschriebenen Tests, so daß dieser nur zur Kontrolle der nach 2.2.5.2 vermessenen Proben eingesetzt wurde.

¹⁶ Reagenzien 1B, 2B und 3B sind die im kommerziellen Test enthaltenen Mischungen (Firmengeheimnis des Herstellers).

2.2.6 Besonderheiten der ^{15}N -Isotopenmarkierungsexperimente

Schon in einem frühen Experimentierstadium existierten Anhaltspunkte, dass die eingesetzte Eisensulfidsuspension Stickstoff zu Ammoniak zu reduzieren vermag, doch wie konnte ein sicherer Nachweis geführt werden? Die Idee, den eingestzten Stickstoff komplett durch $^{15}\text{N}_2$ zu ersetzen und damit das Reaktionsprodukt, also das Ammoniak, mit ^{15}N zu markieren und massenspektrometrisch nachzuweisen, musste schnell wegen der nicht finanzierbaren Gasmenge fallen gelassen werden. Zur Hilfe kam die in der Geochemie, Biogeochemie sowie Archäologie verbreitete Methode der Isotopenverhältnis-Massenspetrometrie (IRMS) vgl. dazu^{[65][66][67][68]}: Sie schaffte die Voraussetzung für eine dramatische Reduzierung des nötigen ^{15}N -Anteils in dem eingesetzten Stickstoff.

Es konnte deshalb in der zu untersuchenden Reaktion molekularer Stickstoff in einem definierten $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ -Verhältnis, das sich nur *geringfügig* von dem natürlichen $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ -Isotopenverhältnis unterschied, eingesetzt werden. Das Isotopenverhältnis des bei der Reaktion entstandenen und aufgefangenen Ammoniaks gibt dann Aufschluß über den Verlauf der Reaktion.

Das $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ -Verhältnis wurde so gewählt, dass es signifikant über dem natürlichen Verhältnis und dennoch im genauen Messbereich der empfindlichen Massenspektrometer lag. Als günstig hat sich ein Isotopenverhältnis um $^{29/28}\delta=130-140\text{‰}$ erwiesen¹⁷.

Isotopenchemische Analysen stellen besondere Anforderungen an die experimentelle Durchführung und Aufarbeitung der Proben, s. dazu auch das folgende Kapitel 2.2.6.2. Es mußte beim Aufbau der Apparatur und bei allen der Reaktion folgenden Schritten darauf geachtet werden, daß keine Isotopenfraktionierung auftrat. Ein kontrollierender Blindversuch war der Einsatz von kommerziell erhältlichem Ammoniumsulfat, mit natürlicher Stickstoffisotopenhäufigkeit. Die Stickstoffisotopenverteilung wurde vor und nach den Blindversuchen mit einem kompletten Durchlauf der ganzen Anlage, dem Isolierungs- und Trocknungsprozeß, bestimmt.

17 zur Definiton des δ -Wertes s. Kapitel 2.2.6.1

2.2.6.1 Definition des δ -Wertes

Da es für die Argumentation des gesamten Experimentes von entscheidender Wichtigkeit ist, soll an dieser Stelle die Notation $^{29/28}\delta\text{-(N}_2\text{)}$ erklärt werden^{[65][67][68]}:

Der in der Isotopenverhältnis-Massenspektrometrie oft gebrauchte δ -Wert gibt die relative Abweichung der Differenz des Isotopenverhältnisses einer Probe zu dem Isotopenverhältnis eines internationalen Standards an. Da diese Abweichung in natürlichen Systemen meist sehr klein ist, wird die Differenz in ‰ angegeben.

Der $^{29/28}\delta\text{-(N}_2\text{)}$ -Wert wird wie folgt berechnet:

$$\begin{aligned} \delta(^{15}\text{N})[\text{‰}] &= \left(\frac{R(\text{Probe})}{R(\text{Standard})} - 1 \right) \cdot 1000 = \left(\frac{\left(\frac{c(^{15}\text{N})}{c(^{14}\text{N})} \right)_{\text{Probe}}}{\left(\frac{c(^{15}\text{N})}{c(^{14}\text{N})} \right)_{\text{Standard}}} - \frac{\left(\frac{c(^{15}\text{N})}{c(^{14}\text{N})} \right)_{\text{Standard}}}{\left(\frac{c(^{15}\text{N})}{c(^{14}\text{N})} \right)_{\text{Standard}}} \right) \cdot 1000 \\ &= \left(\frac{\left(\frac{c(^{15}\text{N})}{c(^{14}\text{N})} \right)_{\text{Probe}}}{\left(\frac{c(^{15}\text{N})}{c(^{14}\text{N})} \right)_{\text{Standard}}} - 1 \right) \cdot 1000 \end{aligned} \quad (1)$$

wobei $R(\text{Probe})$ das Isotopenverhältnis der Probe und $R(\text{Standard})$ das Isotopenverhältnis des Standards ist.

2.2.6.2 Probenvorbereitung für die ^{15}N -Isotopenanalytik

Die Probenvorbereitung beginnt wie in Kapitel 2.2.5.1, S.50 beschrieben. Nach einem Experiment wird die komplette schwefelsaure Lösung von Ammoniumsulfat mit einer entsprechenden Menge KCl versetzt. Danach wird im Rotationsverdampfer das Wasser entfernt - aus der überschüssigen Schwefelsäure entsteht K_2SO_4 . Dies ist notwendig, da die IRMS-Analyse auf Festproben basiert, welche in Zink- bzw. Ag-Kapseln eingewogen werden. Die Kapseln können von H_2SO_4 zerstört werden. Das hierbei entstehende K_2SO_4 beeinflusst die IRMS-Messungen nicht nachweisbar.

2.2.6.3 ^{15}N -Isotopenanalytik (IRMS)

Der entstandene, angereicherte Ammoniak wurde, wie in 2.2.5.1 und 2.2.6.2 beschrieben, mit 100 ml¹⁸ N/1000 mol/l H_2SO_4 aufgefangen. Die Schwefelsäuremenge ist nicht zu groß, um bei der Probenvorbereitung leicht entfernt zu werden. Für die Einwaage der Proben zum IRMS wird Festsubstanz benötigt, dazu muss, wie vorher beschrieben, die überschüssige Schwefelsäure zuvor vollständig entfernt werden. Dies erfolgte, wie in Kapitel 2.2.6.2 erwähnt, durch Zugabe einer KCl-Lösung; nach Entfernen des Wassers werden die entsprechenden Sulfate erhalten.

Die einzelnen Apparaturteile - besonders die der Destillationsapparatur zur Trocknung der Proben - mußten sorgsam auf ^{15}N -Verunreinigungen geprüft werden. Dies ist notwendig, da ^{15}N in der Glaswand und anderen Apparaturteilen absorbiert werden kann und zu einem „ ^{15}N -Memory-Effekt“ bei nachfolgenden Proben führen könnte. Hierzu wurde wieder kommerziell erhältliches Ammoniumsulfat und KCl in der Destille gelöst, getrocknet und anschließend mit IRMS vermessen.

Vor jeder Trocknung einer um ^{15}N angereicherten Probe wurde erst eine Blindprobe aus kommerziellem Ammoniumsulfat, mit natürlicher Isotopenhäufigkeit, und Kaliumchlorid durch Lösung in Wasser hergestellt und wieder getrocknet¹⁹. Nach jeder Trocknung wurde die Destille sorgsam mehrmals mit Wasser und verdünnter Essigsäure gespült.

2.2.6.4 Synthese von Li_3N zur Bestimmung des Stickstoffisotopen-Verhältnisses

Für die Entscheidung, ob ein Stickstofffixierungsexperiment einen positiven Verlauf hat, muß die Ausgangsisotopenzusammensetzung der eingestzten Stickstoffisotopenmischung bekannt sein. Der Hersteller und Lieferant (*Linde AG*) war jedoch nicht in der Lage, hinreichend genaue Analysen seiner Gasmischungen mitzuliefern²⁰. Aus diesen und den in 2.2.4 genannten Gründen erwies es sich als ausgesprochen schwierig, eine genaue quantitative Bestimmung der Isotopenzusammensetzung des eingesetzten, leicht um ^{15}N angereicherten Gases durchzuführen.

18 100 ml dieser Schwefelsäure sind in der Lage, für die angestrebten Messungen hinreichend viel NH_3 zu binden.

19 Wäre hier eine Veränderung im Stickstoffisotopenverhältnis nachweisbar, wäre die Trocknungsapparatur mit ^{15}N kontaminiert.

20 Eine solche Analyse wäre auch wegen mangelnder zertifizierter Analyse-Einrichtungen für Stickstoffisotope in Deutschland kaum möglich.

Mit massenspektrometrischen Methoden ist sie nur sehr schwer quantitativ zugänglich²¹. Deshalb wurde ein anderer Weg beschritten: Li reagiert bei hohen Temperaturen (800°C) quantitativ mit Stickstoff zu Li₃N.



Li₃N kann durch einfache Hydrolyse zu Ammoniak zersetzt werden.



Wird Li₃N in verdünnter H₂SO₄ hydrolysiert, so entsteht (NH₄)₂SO₄, welches mit der oben beschriebenen IRMS vermessen werden kann. Hieraus kann die Isotopenverteilung bestimmt werden, wie sie der aus dem Stickstoffassimilations-Experiment erzeugte Ammoniak haben müsste. Die ursprüngliche Stickstoffmischung wird durch diese Behandlung „equilibriert“, d.h. die Isotopenverteilung der einzelnen Spezies entspricht nach dem Experiment der stochastischen Verteilung der Isotope. Durch die hohen Temperaturen kann ein Isotopen-Effekt, d.h. die Bevorzugung eines Isotopes gegenüber einem andern während der Reaktion, nahezu ausgeschlossen werden.

Gemäß unseren Vorgaben wurde von der *Fa. Linde AG* eine Stickstoffisotopenmischung hergestellt. Entsprechend den Angaben des Herstellers soll die bei unseren Umsetzungen verwendete Gasmischung einen ^{29/28}δ-Wert (siehe Kaptiel 2.2.6.1) von ca. 138 ‰ aufweisen²².

Das hergestellte Li₃N wurde in verdünnter Schwefelsäure (N/1000 mol/l) hydrolysiert und das erhaltene Ammoniumsulfat gemäß 2.2.5.1 und 2.2.6.2 getrocknet und mit IRMS vermessen.

Die ¹⁵N-Bestimmung des Ammoniumsulfates, das durch Hydrolyse von Li₃N entstanden ist, ergab einen ^{29/28}δ-Wert von 129.7 ‰. Damit ist die Isotopenzusammensetzung der Gasmischung in für das Experiment ausreichender

21 Ein Hauptgrund ist der apparative Aufbau der Massenspektrometer - die Masse 30 wird von in der Ionenquelle des Massenspektrometers entstehendem ¹⁴N¹⁶O verfälscht.

22 eine theoretische Abschätzung des (equilibrierten) ^{29/28}δ-Wertes

Fehlergrenze verifiziert²³ - für die erfolgreiche Durchführung eines Stickstofffixierungs-Experiments mit Isotopenmarkierung ist nur der Nachweis von Ammoniak mit einer Signifikanz über der natürlichen liegenden Isotopenverteilung notwendig.

2.2.7 Isotopenverdünnungsexperimente

Von großer Bedeutung war die Bestimmung der Verunreinigungen an Ammoniak und anderen Stickstoffverbindungen, welche durch die eingesetzten Chemikalien (z.B. in Form von Ammoniumsalzen oder Nitraten) eingeschleppt worden sein könnten. Da es sich dabei um geringe Mengen handelte, war deren sichere Bestimmung mit gängigen analytischen Methoden nicht möglich. Einen Ausweg bot die Isotopenverdünnungsmethode. Bei ihr werden zu einer unbekanntem Isotopenmischung eine bekannte Isotopenmischung zugesetzt und die Änderung der Isotopenverteilung gemessen. Aus der ermittelten Isotopenverteilung kann die unbekanntem Isotopenverteilung errechnet werden. Dies ist die Methode der Wahl zur Bestimmung von Isotopenkonzentrationen im Spurenbereich. Eine detaillierte Beschreibung dieser in der chemischen Laborpraxis wenig gebräuchlichen Methode wurde wegen des längeren Rechenweges zur Erläuterung und Herleitung in den Appendix 9.2 verlegt.

Mit dieser Methode ist es uns gelungen, die Größenordnung des Gehaltes an ubiquitärem Stickstoff auf 0,4 mg/l – 0,5 mg NH₄⁺/l in den zur Herstellung unserer Sulfidsuspension eingesetzten Chemikalien abzuschätzen. Dieser Wert steht in Einklang mit der „worst case“ Abschätzung (3.1.1).

2.3 Apparativ analytische Methoden

Um sie konzentriert beschreiben zu können, wurde ein separater Abschnitt gewählt.

2.3.1 Isotopen-Massenspektrometrie (IRMS-Methode)

In Zusammenarbeit mit dem Max-Planck-Institut für Biogeochemie Jena konnte ein Delta Plus-XL-Isotopenmassenspektrometer (*Finnigan MAT, Bremen*) zur genauen Bestimmung der Isotopenverteilung genutzt werden.

2.3.1.1 IRMS-Apparatur

Die „Isotope Ratio Mass Spektroskopie“ (Isotopen-Verhältnis-Massen-Spektrometrie, kurz IRMS) erlaubt eine sehr genaue Bestimmung der Abweichung des Isotopenverhältnisses einer Probe relativ zu dem natürlichen Isotopenverhältnis des

²³ Da der Versuch bei sehr hohen Temperaturen (bis zu 800°C) durchgeführt wurde, ist ein starker Isotopeneffekt auszuschließen.

entsprechenden Elementes. Hierfür werden speziell konstruierte Massenspektrometer eingesetzt (z.B. Finnigan MAT Delta Plus-XL). Gemessen wird die Abweichung des Isotopenverhältnisses der Probe gegen einen international festgelegten Standard. Die Genauigkeit der Messung liegt bei unter 1 ‰ Abweichung. Den Messaufbau zeigt die folgende Abbildung 16:

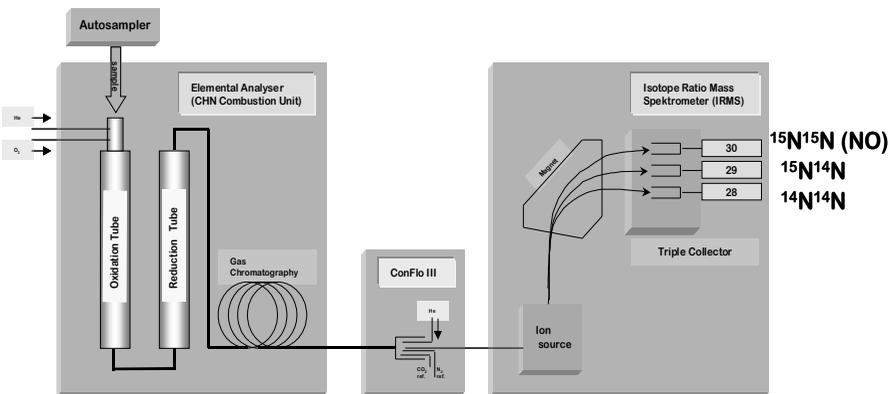


Abbildung 16 Schematischer Aufbau einer Apparatur zur Bestimmung des Stickstoffisotopenverhältnisses

Die festen Proben werden in Zinn oder Silberkapseln eingewogen und in das Autosampler-Karussell gelegt. Von dort fallen sie – progammgesteuert – in einen CHN-Analysator. Zunächst wird in einem *Oxidationsrohr*, welches mit elementarem Cu [CuO oder einem anderen geeigneten Oxidationsmittel] gefüllt ist, die Probe in einer Helium/Sauerstoffatmosphäre bei circa 600°C oxidiert. Es folgt die Überführung der flüchtigen Stickstoffverbindungen in das *Reduktionsrohr*, in dem die vorher entstandenen Stickoxide zu N₂ reduziert werden. Gleichzeitig wird hier überschüssiger Sauerstoff gebunden. In einer Trockensäule wird möglicherweise vorhandenes Wasser absorbiert. Zur Auftrennung der erhaltenen Gase werden diese durch einen Gaschromatographen geleitet und gelangen in die Interface-Einheit (*ConFloIII*). Dieses „open-split-System“²⁴ erlaubt die gleichzeitige präzise Messung mehrerer Elemente. Im speziell für die Isotopentrennung konstruierten Massenspektrometer werden die Verbindungen in ihre Isotopomere aufgetrennt und in drei Faraday-Blechern detektiert. Die drei Becher repräsentieren die drei Massen, die gleichzeitig gemessen werden sollen. Ein Rechner wertet die erhaltenen Daten online aus.

24 Das System ist so benannt, da es offen gebaut ist und den Gasstrom teilt.

2.3.1.2 Die IRMS-Meßsequenz

Die Meßsequenz jeder einzelnen Messung wird durch Abbildung 17 verdeutlicht (die hier dargestellte Probe enthält sowohl Stickstoff wie Kohlenstoffanteile):

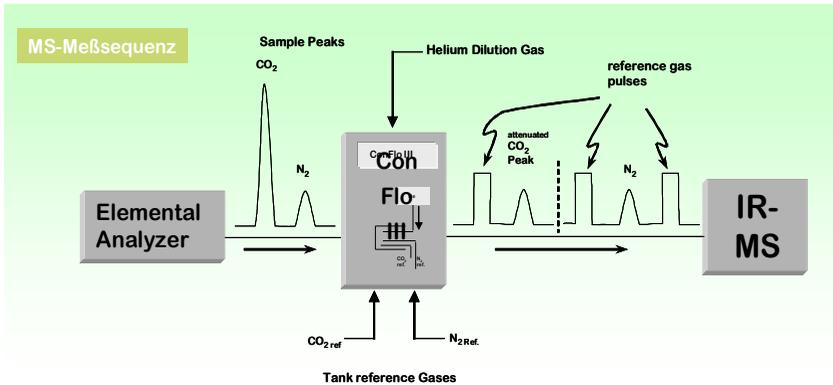


Abbildung 17 IRMS-Meßsequenz

Jede Probenmessung wird, wie oben beschrieben, in N_2 (und bei C-haltigen in CO_2) zerlegt. So erreichen die beiden Gase die ConFloIII-Einheit (sie bildet die Schnittstelle zum Massenspektrometer). In ihr wird der Gasstrom des Elementaranalytators zum einen verdünnt, ohne dass sich die Isotopenzusammensetzung ändert und zum anderen werden hier vor und nach jedem Probenpeak Referenzgaspeaks zugemischt, so dass auch innerhalb einer Messung eine Kontrolle über die Genauigkeit der Messung möglich ist. Hieraus folgt eine typische Meßsequenz: Referenzgas (N_2) → N_2 (Probe₁) → Referenzgas (N_2) → Referenzgas (CO_2) → CO_2 (Probe₁) → Referenzgas (CO_2).

2.3.1.3 Mehrstufige Kalibration bei der IRMS

Die gesamten IRMS-Messungen sind einer mehrstufigen Kontrolle und Kalibration unterworfen. Die drei Ebenen werden in Abbildung 18 dargestellt:

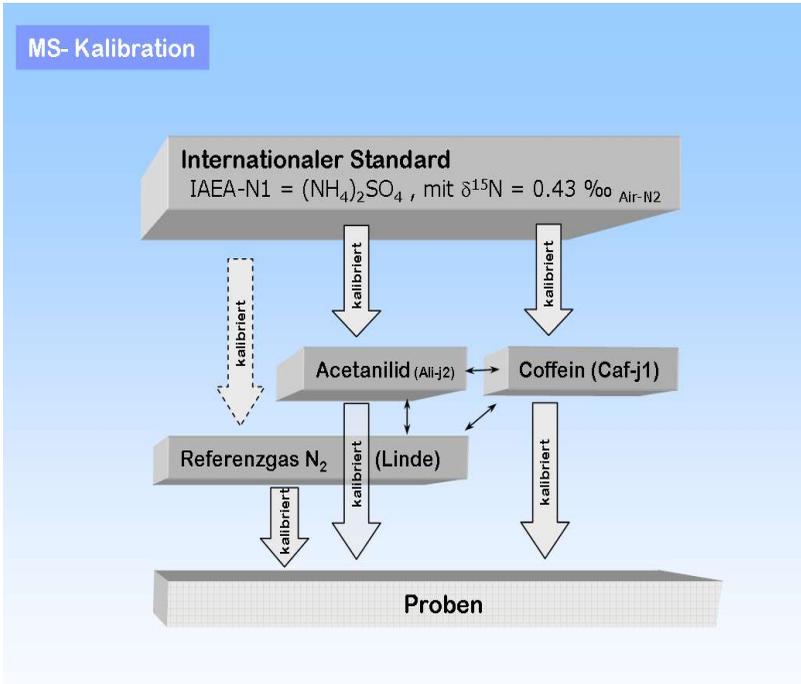


Abbildung 18 Mehrstufige Kalibration der IRMS

- 1) Das „Dach“ der Kalibration bildet der Internationale Standard IAEA-N1 (ein Ammoniumsulfat-Standard mit einer bekannten Isotopenzusammensetzung, die in Ringversuchen gegen Luftstickstoff kalibriert wurde).
- 2) In einer Messreihe (von bis zu 90 Messungen) werden zu bestimmten Punkten Acetanilid- und Coffeinstandards eingewogen und vermessen. Dies dient der Kalibration innerhalb der Messreihe;
- 3) vor und nach jeder Messung wird ein Referenzgaspeak vermessen, gegen den die Abweichung des Isotopenverhältnisses bestimmt wird.

Mit diesem Geflecht aus gegenseitigen Kalibrationen, was Konsistenzprüfungen der Messwerte erlaubt, wird die angestrebte hohe Präzision der Messungen kontrolliert.

2.3.2 Röntgenpulverdiffraktometrie

Mittels Röntgenpulverdiffraktometrie sollte untersucht werden, ob und welche charakteristischen Phasen bei folgenden Probengruppen auftreten:

- (1) Frisch gefälltes Eisensulfid vor den Stickstofffixierungsexperimenten
- (2) Eisensulfid nach einem Fixierungsexperiment
- (3) Durch inverse Micellen-Technik (s.2.5) gewonnene Eisensulfid-Nanoteilchen.

2.3.2.1 Präparation der Proben aus Gruppe (1) und (2)

Durch Zentrifugation wurde das Eisensulfid getrennt und so lange mit sauerstofffreiem Wasser gewaschen, bis kein BaSO_4 nach Zugabe einer BaCl_2 -Lösung aus der Waschlösung ausfiel. Anschließend erfolgte Gefriertrocknung der Proben. Die vollständige Entfernung von Na_2SO_4 ist notwendig, um die schwachen Reflexe der Eisensulfidphasen nicht durch starke Reflexe des Na_2SO_4 zu überdecken.

2.3.2.2 Präparation der Proben aus Gruppe (3)

Die Probengruppe (3) war schwierig zu präparieren, da die Eisensulfidsuspensionen durch Kolloidbildung auch nach 12 h Zentrifugation nicht sedimentierten. Nur die Zugabe eines Kupferplättchens (z.B. 1-cent-Stück) brachte die gewünschte Destabilisierung des Kolloides. Der Eisensulfid-Niederschlag wurde mehrmals mit n-Heptan gewaschen, um ihn von überschüssigen AOT zu befreien, und anschließend an der Ölpumpe getrocknet.

Für alle Proben gilt:

Die getrockneten Eisensulfidproben wurden möglichst unter Luftabschluß auf einen flachen Kunststoffträger aufgebracht, und das Beugungsexperiment wurde mit $\text{Fe}_{K\alpha}$ -Strahlung durchgeführt.

2.3.3 Raman-Spektroskopie

Das bei der Reaktion (1) entstandene FeS_2 (Pyrit) wurde Raman-spektroskopisch untersucht. Die Raman-Streuung basiert auf einer unelastischen Wechselwirkung von Licht mit Molekülen. Die Raman-Spektren wurden mit einem Mikro-Raman-Setup (*Labram, Dilor*) aufgenommen. Das verwendete Spektrometer hatte eine Brennweite von 300 mm und ein Gitter von 950 Linien/mm. Die spektrale Auflösung lag bei 4 cm^{-1} . Die Anregungswellenlänge des He/Ne-Lasers mit einer Leistung von 20 mW lag bei 633 nm. Der Laserstrahl wurde mit einem Olympus MLPlanFL 50 Objektiv auf die Probe fokussiert.

2.4 N₂-Aktivierung im UV-Licht

Im Zuge der Variierung der Reaktionsbedingungen wurde der Fragestellung nachgegangen, ob die N₂-Fixierung unter Bestrahlung mit UV-Licht zu höheren Umsätzen und Ausbeuten führt. Dazu wurde ein geeigneter Dünnschichtreaktor entwickelt (Abbildung 19):

(1) Eine große Probenoberfläche und damit eine optimale Bestrahlung wird durch einen dünnen Eisensulfid-Suspensionsfilm, der durch die Verteilerscheibe und den Rotor erzeugt wird, gewährleistet. Dies ist wichtig, da die Eindringtiefe des UV-Lichtes nur einige Millimeter beträgt.

(2) In der Kreislaufapparatur wird die Eisensulfid-Suspension kontinuierlich umgepumpt.

(3) Da der Großteil des Gerätes aus Glas bzw. Spezialkunststoffen, die sich inert gegenüber Stickstoff verhalten, besteht, sollte die Stickstoffaktivierung nicht beeinflusst werden.

(4) Das Doppelwandgefäß mit Thermostat und Heizflüssigkeit kann bei einer konstanten Innentemperatur von 80°C betrieben werden.

(5) Das Quarzrohr der UV-Lampe ermöglicht eine optimale Lichtdurchlässigkeit.

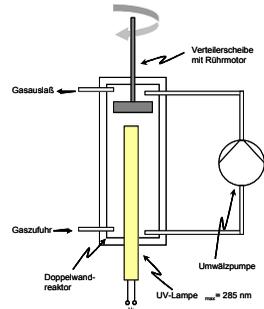


Abbildung 19 UV-Belichtungsapparatur

2.5 Herstellung von mikro- und nanopartikulären Eisensulfiden

Zwei Varianten zur Herstellung von Mikro- und Nano-FeS-Partikel in inversen Mizellen wurden getestet und erfolgreich angewendet.

Variante 1:

Alle Arbeiten werden unter Argon durchgeführt. Es werden 50 ml n-Heptan (*Fa. MERCK*) und 3,5 g AOT (Dihexylnatriumsuccinat) in einen 100 ml Dreihalskolben mit Gaseinleitungsrohr, Stopfen, Magnetrührer ($U = 500 - 1000/\text{min}$) und Septum gegeben. Es wird ca. 15 min Argon durch die gerührte Heptanlösung geleitet. Anschließend wird 1 ml sauerstofffreies Wasser zugegeben und eine Stunde bei 500 - 1000 U/min gerührt. Nun werden etwa 20 ml dieser AOT-Mikroemulsion abgetrennt, und diese unter kräftigem Rühren mit 0,1 ml einer 1 M sauerstofffreien wässrigen Na_2S -Lösung versetzt. Man gibt in die restlichen 30 ml Heptanlösung 0,11 - 0,15 ml einer 1 M sauerstofffreien wässrigen $\text{Fe}(\text{ClO}_4)_2$ -Lösung. Beide Mischungen lässt man 1 h bei 500 - 1000 U/min rühren. Zur Fällung der Eisensulfidpartikel tropft man anschließend die Na_2S -Lösung langsam zu der $\text{Fe}(\text{ClO}_4)_2$ -Lösung, wobei sich sofort eine tiefschwarze Suspension bildet, welche weiter kräftig gerührt werden muss, um die Agglomeration der Partikel zu verhindern.

Variante 2:

Alle Arbeiten werden unter Argon durchgeführt. Es werden 50 ml n-Heptan (*Fa. Merck*) und 3,5 g AOT (Dihexylnatriumsuccinat) in einen 100 ml Dreihalskolben mit Gaseinleitungsrohr, Stopfen, Magnetrührer ($U = 500 - 1000/\text{min}$) und Septum gegeben. Es wird ca. 15 min Argon durch die gerührte Heptanlösung geleitet. Anschließend wird 1 ml sauerstofffreies Wasser zugegeben und eine Stunde bei 500 - 1000 U/min gerührt. Im Gegensatz zu **Variante 1** setzt man 33 mg festes $\text{Fe}(\text{ClO}_4)_2$ -Hydrat der n-Heptan-AOT-Lösung zu und lässt wieder 30 min bei Raumtemperatur und 500 - 1000 U/min rühren. Zur Fällung der Eisensulfidpartikel wird anschließend langsam H_2S -Gas dem Argonstrom beigemischt, bis die Fällungsreaktion beendet ist. Die Lösung färbt sich langsam bräunlich und bei weiterem Zusatz von H_2S tiefschwarz. Die erhaltene Suspension wird weiter kräftig gerührt, um eine Agglomeration der Partikel zu verhindern. Die Verwendung von H_2S -Gas als Fällungsreagenz führte im Gegensatz zur Fällung mit Na_2S zu einer gleichmäßigeren Teilchengrößenverteilung. Die nach **Variante 1** und **2** erzeugten Eisensulfid-Partikel wurden mit Rasterelektronenmikroskopie (s. 2.5.1.2), Transmissionselektronenmikroskopie (2.5.2) und Elektronenstrahlmikroanalyse (2.5.3) untersucht.

2.5.1 Rasterelektronenmikroskopie (REM)

Die Rasterelektronenmikroskopie (*Scanning Electron Microscopy* - SEM) wurde, wie die Röntgenpulverdiffraktometrie, in zwei Bereichen eingesetzt:

- (1) Untersuchung von frisch gefälltem Eisensulfid, wie es in der „pilot plant“-Apparatur zur Stickstofffixierung verwendet wird,
- (2) Untersuchung der nach (2.5) hergestellten Eisensulfid Mikro- und Nanopartikel.

2.5.1.1 Präparation der frisch gefällten Eisensulfidproben

Ein Tropfen der frisch gefällten Eisensulfidsuspension wird auf einem Deckgläschen verteilt und unter Sauerstoffausschluß getrocknet. Hierbei haften sich die Eisensulfidpartikel an die Glasoberfläche. Durch vorsichtiges Spülen mit sauerstofffreiem Wasser und anschließendem Trocknen können die Proben präpariert werden.

2.5.1.2 Präparation der Eisensulfid Mikro- und Nanopartikelproben

Ein Tropfen der nach Kapitel 2.5 **Variante 1** oder **2** erhaltenen Eisensulfid-Suspension wurde in einer Argonatmosphäre auf ein Glasplättchen gegeben und das Lösungsmittel bis zur Trockene im Vakuum abgedampft. Das überschüssige AOT wird durch zweimaliges Waschen mit n-Heptan entfernt.

Die nach beiden Präparationstechniken erhaltenen Proben wurden mit Graphit bedampft und im Rasterelektronenmikroskop (Zeiss: DSM 940A) untersucht.

2.5.2 Transmissions-Elektronenmikroskopie (TEM)

Für die transmissionselektronischen Aufnahmen wurde ein Tropfen der nach (2.5) hergestellten Eisensulfidnanopartikel-Suspension auf ein graphitbedampftes Kupfergitter gebracht. Anschließend wurde die Suspension getrocknet, und die Probe 2-3 Mal mit n-Heptan gewaschen, bevor sie im Transmissions-Elektronenmikroskop abgebildet wurde.

2.5.3 Elektronenstrahlmikroanalyse (EDX)

Mit Hilfe der Elektronenstrahlmikroanalyse (*energy-dispersive X-ray spectroscopy -EDX*) (Oxford Instruments: eXL 10) werden die nach 2.5, **Variante 1** hergestellten Eisensulfid-Mikropartikel auf ihre Elementzusammensetzung hin untersucht. Auf Grund der apparativen und physikalischen Limitierungen ist für dieses Messverfahren ein minimaler Teilchendurchmesser von etwa 1 μm notwendig. Die nach 2.5, **Variante 2** hergestellten Eisensulfid-Partikel mit einem Teilchendurchmesser, der sehr viel kleiner war als 1 μm , konnten deshalb nicht untersucht werden.

2.6 Ergebnisse der Untersuchung von Eisensulfid Mikro- und Nanopartikeln

2.6.1 Rasterelektronenmikroskopie der Eisensulfidpartikel

Abbildung 20 (links und mitte) zeigt typische Bilder der annähernd sphärischen Partikel, die einen Durchmesser bis zu 400 nm aufweisen. Abbildung 20 (rechts) zeigt zum Vergleich Eisensulfid, das ohne Verwendung von inversen Micellen frisch gefällt wurde.

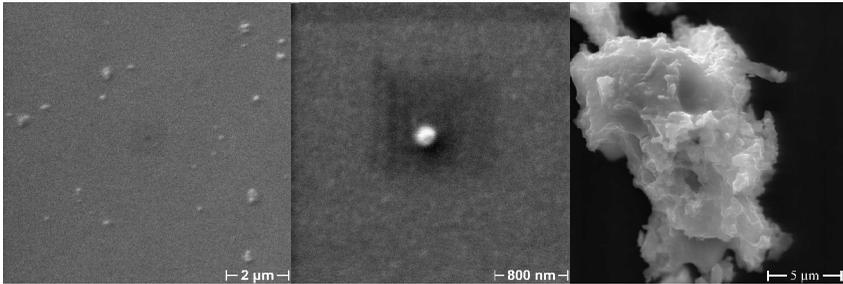


Abbildung 20 FeS-Teilchen: (links) Nanopartikel (mitte) ein Nanopartikel (rechts) Vergleichspartikel aus gewöhnlicher FeS-Fällung

2.6.2 Transmissions Elektronenmikroskopie der Eisensulfidpartikel

Teilchen sehr ähnlicher Größenverteilung konnten nach 2.5 Variante 2 mit der H_2S -Fällung gewonnen werden. Die durchschnittliche Teilchengröße lag bei 15 nm bis 150 nm (s. Abbildung 21).

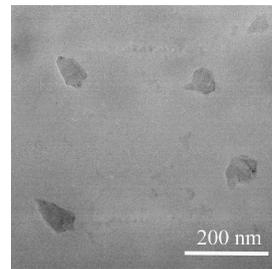


Abbildung 21 TEM-Aufnahme eines FeS-Nanopartikels

2.6.3 Elektronenstrahlmikroanalyse der Eisensulfidpartikel

Mit Hilfe der Elektronenstrahlmikroanalyse konnte gezeigt werden, dass die nach 2.5, **Varinte 1** hergestellten Teilchen auf der Deckgläschenoberfläche aus Eisen und Schwefel bestehen. Eine Stöchiometrieabschätzung ergab ein Eisen-zu-Schwefel-Verhältnis von $1 : 1,1 \pm 0,1$. Als weitere Elemente waren nur noch Si und Na des Glasträgers vorherrschend (s. Abbildung 22).

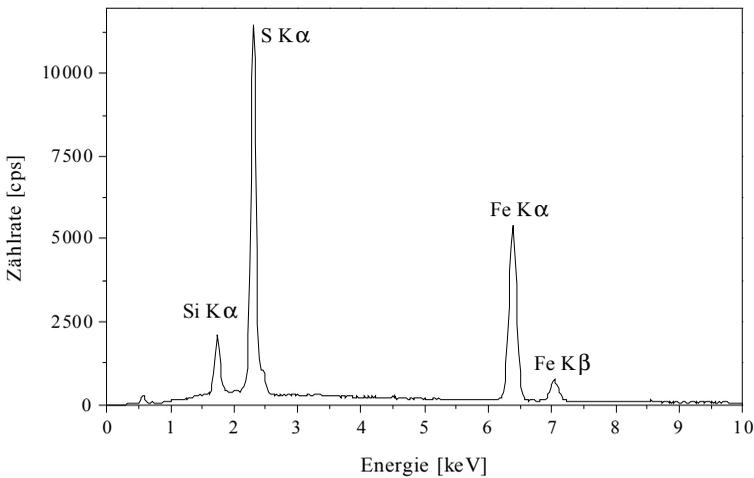


Abbildung 22 EDX-Spektrum eines Eisensulfid-Mikropartikels

3 Zusammenstellung der Ergebnisse

3.1 Die Herstellung von Ammoniak in der Pilotanlage

Zunächst wurde eine Reihe von Vorversuchen durchgeführt, die bereits nötige Hinweise zur N_2 -Aktivierung gaben und die Entwicklung einer geeigneten „pilot plant“-Apparatur zum Ziel hatten. In der Tabelle 1 sind repräsentative Experimente zur N_2 -Fixierung am Eisensulfid zusammengefasst, die in der Standard-pilot-plant-Apparatur (2.2.1, s.S.43) unter leichter Variation der Reaktionsbedingungen erfolgten.

Tabelle 1 Übersicht repräsentativer Stickstofffixierungsexperimente im "pilot-plant"-Maßstab

No.	Reaktionsdauer[d]	Medium	Gas	Eigenschaften	Ergebnisse
1	~ 22	3mol FeSO ₄ , 3 mol Na ₂ S, Phosphorsäure	¹⁴ N ₂	Phosphorsäure-Zusatz, Optimierung der Apparatur (pH-Elektrode zur Überwachung)	ca. 2 mg NH ₃ konnten nachgewiesen werden
2	~ 53	3mol FeSO ₄ , 3 mol Na ₂ S	¹⁴ N ₂	Fällung des Eisensulfides bei RT	ca 1,8 mg NH ₃ konnten nachgewiesen werden
3	~ 78	3mol FeSO ₄ , 3 mol Na ₂ S	¹⁴ N ₂	Fällung des Eisensulfides bei RT	ca, 1,0 mg NH ₃ konnte nachgewiesen werden
4	~ 120	3mol FeSO ₄ , 3 mol Na ₂ S	¹⁴ N ₂	N ₂ Strom 0.5l/h	ca. 1,7 mg NH ₃ konnten nachgewiesen werden
5	~ 66	3mol FeSO ₄ , 3 mol Na ₂ S	¹⁴ N ₂	N ₂ Strom 0.5l/h	ca. 0.5 mg NH ₃ konnten nachgewiesen werden
6	~ 60	3mol FeSO ₄ , 3 mol Na ₂ S	¹⁵ N ₂	erster Versuch mit 505 VPM ¹⁵ N ¹⁵ N-Markierung	ca 3,7 mg NH ₃ konnten nachgewiesen werden
7	~ 83	3mol FeSO ₄ , 3 mol Na ₂ S	¹⁵ N ₂	Wiederholungsversuch	ca. 3,6 mg NH ₃ konnten nachgewiesen werden
8	~ 10	H ₂ SO ₄ , NaOH	¹⁴ N ₂	Versuch ohne FeS	ca. 0,5 mg NH ₃ konnten nachgewiesen werden = Blindwert
9	~ 56	3mol FeSO ₄ , 3 mol Na ₂ S	¹⁴ N ₂	Stickstoffstrom 5l/h	ca. 1,2 mg NH ₃ konnten nachgewiesen werden
10	~ 61	3mol FeSO ₄ , 3 mol Na ₂ S	¹⁵ N ₂	Wiederholungsversuch	NH ₃ konnte nachgewiesen werden, auf genauere quantitative Bestimmung wurde verzichtet, um möglichst viel Probenmaterial für die Isotopenmessungen zu gewinnen
11	~ 31	3mol FeSO ₄ , 3 mol Na ₂ S	Ar	nur Ar	NH ₃ konnte nicht nachgewiesen werden
12	~ 114	3mol FeSO ₄ , 3 mol Na ₂ S	¹⁵ N ₂	Gaswaschkaskade	¹⁵ NH ₃ konnte nachgewiesen werden, auf genauere quantitative Bestimmung wurde verzichtet, um möglichst viel Probematerial für die Isotopenmessungen zu gewinnen
13	~ 66	3mol FeSO ₄ , 3 mol Na ₂ S	¹⁵ N ₂	Doppelreaktor	NH ₃ konnte nachgewiesen werden, auf genauere quantitative Bestimmung wurde verzichtet, um möglichst viel Probematerial für die Isotopenmessungen zu gewinnen

3.1.1 Erläuterungen zu den Versuchen 1-13 in Tabelle 1

Die in Tabelle 1 dokumentierten Mengen an Ammoniak beziehen sich auf die Gesamtmenge an Ammoniak, die über den Verlauf des Experimentes aufgefangen werden konnte.

Der Leser beachte die langen Zeiträume, die pro Versuch notwendig waren. Die Zeit zwischen einzelnen Experimenten wurde genutzt, um weitere Entwicklungen an der Apparatur durchzuführen.

Versuch 1

Als Säure wurde nicht Schwefelsäure, sondern Phosphorsäure verwendet, die eine geringere Acidität als die sonst verwendete Schwefelsäure besitzt.

Versuche 2

In diesem Versuch sollte getestet werden, ob sich die Ammoniakmenge ändert, wenn das Eisensulfid bei Raumtemperatur gefällt wird.

Versuch 3

Versuch 3 ist ein Wiederholungsversuch von 2.

Versuch 4

Als Vorbereitung für die Isotopenmarkierungsversuche, die in der zur Verfügung stehenden Gasmenge limitiert waren, mußte überprüft werden, ob ein geringer Gasstrom von 0,5 l/min noch ausreichte, um hinreichend viel Ammoniak für analytische Tests zu produzieren.

Versuch 5

Versuch 5 diente der Reproduktion der Ergebnisse von Versuch 4.

Versuch 6 (¹⁵N-Markierung)

Versuch 6 ist der erste einer Reihe von Stickstofffixierungsversuchen, die mit einer um ¹⁵N₂ angereicherten Stickstoffisotopenmischung (505 VPM ¹⁵N¹⁵N-Markierung) durchgeführt wurden.

Versuch 7 (¹⁵N-Markierung)

Versuch 7 ist ein Wiederholungsversuch von Versuch 6 mit ähnlichem Resultat.

Versuch 8 (Blindversuch ohne Eisensulfid)

In diesem Blindversuch, der ohne Eisensulfid durchgeführt wurde, konnte die geringe Menge von etwa 0,5 mg Ammoniak gefunden werden.

Versuch 9

In Versuch 9 sollte die Abhängigkeit der auftretenden Ammoniakmenge vom Stickstoffstrom untersucht werden. Durch die Apparatur strömte Stickstoff mit 5 l/h. Die am Ende des Experimentes aufgefangene Gesamtmenge an Ammoniak hatte sich gegenüber den Versuchen mit geringeren Stickstoffflüssen nicht erhöht.

Versuch 10 (mit ^{15}N -Markierung)

Wiederholungsversuch von Versuch 6. Es konnte wieder signifikant ^{15}N -angereicherter Ammoniak nachgewiesen werden.

Versuch 11 (Blindversuch mit Ar anstelle von N_2)

Hier wurde ein Blindversuch mit Eisensulfid und Argon anstelle von N_2 durchgeführt. Es konnte kein Ammoniak nachgewiesen werden. Aus diesem Versuch folgt, daß die in Versuch 8 gefundene Ammoniakmenge von 0,5 mg mit großer Wahrscheinlichkeit auf den nicht vollständig gereinigten Stickstoff zurückzuführen ist.

Versuch 12 (mit ^{15}N -Markierung)

In diesem Versuch wurden erstmals N_2 und Ar nach der in Abbildung 13 dargestellten Methode gereinigt. Es konnte signifikant ^{15}N -angereicherter Ammoniak gefunden werden.

Versuch 13 (mit ^{15}N -Markierung)

Ein weiterer Wiederholungsversuch mit der Besonderheit eines Doppelreaktor-Aufbaus: Es wurden zwei Reaktoren mit dem Ziel hintereinandergeschaltet, alle möglichen Verunreinigungen des Stickstoffisotopengemisches in dem ersten Reaktor abreagieren zu lassen und dann in dem zweiten Reaktor den von Verunreinigungen weitgehend befreiten Stickstoff zur Reaktion zu bringen. Leider kam es bei diesem Versuch zu einer Havarie am ersten Reaktor. Es konnte signifikant ^{15}N -angereicherter Ammoniak nachgewiesen werden.

3.2 Abschätzung der möglichen Verunreinigungen der Reagenzien mit Ammoniak und Ammoniumsalzen

Eine Abschätzung der maximalen Verunreinigungen der einzelnen Reaktionskomponenten mit Ammoniak soll hier vorgenommen werden. Das ist aus zwei Gründen notwendig: Einmal muß zur Beurteilung einer mit unmarkiertem Stickstoff erfolgreich durchgeführten Stickstoffreduktion die maximal zu erwartende Ammoniakmenge durch Verunreinigungen bekannt sein; zum anderen „verdünnen“ diese Verunreinigungen das isotopenmarkierte Ammoniak, so dass, im Vergleich zum theoretischen Wert, eine Abreicherung an ^{15}N festzustellen sein wird.

Die „worst-case“-Abschätzung basiert auf den Angaben des Maximalstickstoffgehaltes der Hersteller und auf der Annahme, dass alle in den eingesetzten Stoffen vorhandenen Stickstoffverbindungen als Ammoniak bzw. Ammoniumsalze vorliegen bzw. darin während der Reaktion umgewandelt werden. Die Ergebnisse der einzelnen Abschätzungen sind in der Abbildung 23 zusammengefasst. Für Stickstoff gibt es zwei Abschätzungen - mit und ohne Verwendung eines Gasreinigers - da der eingesetzte Gasreiniger die Reinheit des Stickstoffes etwa um eine Größenordnung erhöhen sollte; damit läge der maximale Ammoniak-Gehalt des Stickstoffs nicht bei 7,59 mg/1000 L sondern bei 0,759 mg/1000 L. Aus Abbildung 23 ist ersichtlich, dass die Hauptquellen für Ammoniak zum einen in den eingesetzten Salzen für die Fällung des Eisensulfides und zum anderen in den verwendeten Gasen zu suchen sind.

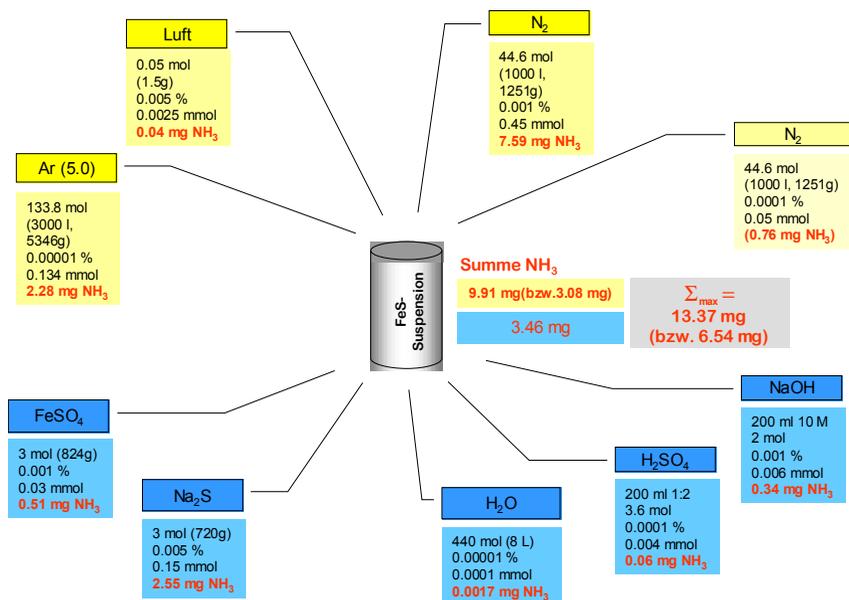


Abbildung 23 Maximalabschätzung der Reaktandenkontamination an Ammoniak im Reaktionsgemisch: (i) Stickstoff mit 0,001% NH₃-Kontamination und (ii) mit 0,0001% NH₃-Kontamination; daraus resultieren die beiden Gesamtsummen 13,37 mg NH₃ bzw. nur 6,54 mg NH₃

Diese Abschätzung hatte wichtige Konsequenzen für die Durchführung der Stickstofffixierungsexperimente: Um die NH₃-Mengen, welche durch die Fällungssalze in die Apparatur gelangen, weitestgehend zu reduzieren, wird die Apparatur vor jedem Stickstoffexperiment zunächst „gereinigt“, d.h. die FeS-Suspension wird direkt im Anschluß an die Fällung auf pH 12-13 gebracht und dann so lange mit Argon gespült, bis in der angeschlossenen Absorptionslösung kein Ammonium mehr nachgewiesen werden kann. Dann erst beginnt mit der Absenkung des pH-Wertes auf 3-4 (mit H₂SO₄) und Umstellung des Gasstromes auf Stickstoff die eigentliche Reaktion.

Die Reduktion der Verunreinigungen im Gasstrom erwies sich als schwieriger: Jeder Reinigungsschritt des Gases hatte eine Erhöhung des Gasdrucks in der Apparatur zur Folge, welche die Genauigkeit der Gasstrommessung beeinträchtigte. Als minimale Reinigungskaskade konnte der in Kapitel 2.2.1 beschriebene Aufbau eingesetzt werden.

3.3 Stickstofffixierung in der UV-Belichtungsanlage

Bei den nach unter Bestrahlung mit UV-Licht durchgeführten Reaktionen entstanden in ersten Experimenten Ammoniakmengen, die um ein Vielfaches höher lagen – etwa 20 - 25 mg

NH₃/Experiment mit 1 mol Eisensulfid – das entspricht fast dem Sechzigfachen der Ammoniakausbeute, die in der Pilotanlage nachgewiesen wurde. Weitere Versuche sind notwendig, um die vorläufigen Ergebnisse zu verifizieren und einen optimalen, störungsfreien Betrieb zu gewährleisten.

3.4 Ergebnisse der Untersuchung des in den Stickstofffixierungsexperimenten verwendeten Eisensulfides

3.4.1 Röntgenpulverdiffraktometrie

Die Pulverdiffraktogramme wurden mit Fe_{Kα}-Strahlung aufgenommen, um ungewollte Dispersionseffekte des Eisens zu vermeiden. Abbildung 24 zeigt das Röntgenpulver-

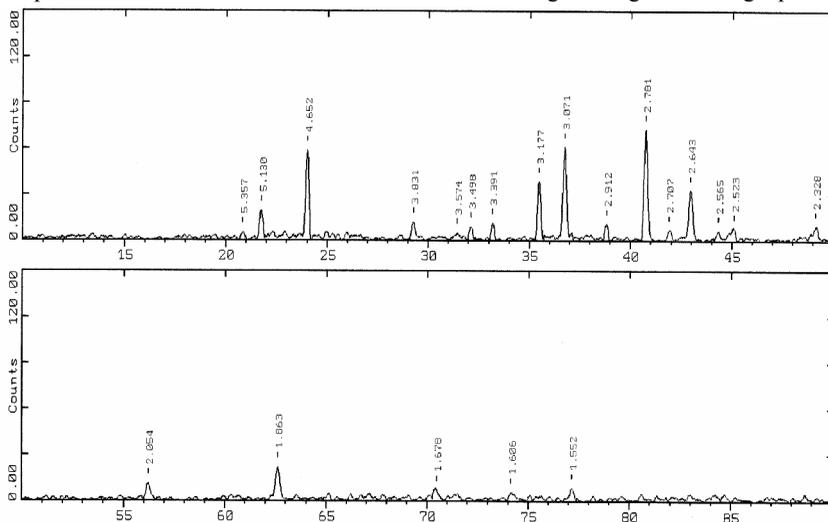


Abbildung 24 Röntgenpulverdiffraktogramm von frisch gefälltem Eisensulfid mit Fe_{Kα}-Strahlung.

diffraktogramm von frisch gefälltem Eisensulfid, in dem Reflexe dominieren, die vor allem restlichem Natriumsulfat zugeordnet werden konnten. Kristallines Eisensulfid und Eisendisulfid konnte in dieser Probe nicht nachgewiesen werden. Dies kann die bei *M. A. A. Schoonen et al.*^{[50][51][52]} beschriebene Beobachtung bestätigen.

Bei Eisensulfid-Proben, die nach Abschluss der N₂-Fixierungsreaktion vermessen wurden, konnte die Bildung von Pyrit zweifelsfrei nachgewiesen werden (s. Abbildung 25). Pyrit bildet hier die Hauptfraktion der kristallinen Substanz.

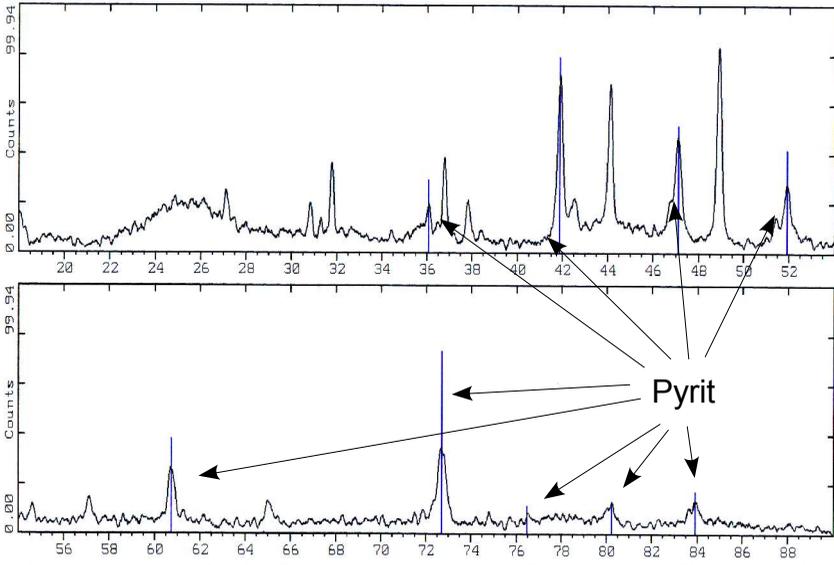


Abbildung 25 Bragg-Reflexion eines Röntgenpulverdiffraktogramms (Fe_{Kα}-Strahlung) von Eisensulfid, das in der Ammoniakbildungsreaktion verwendet wurde, mit deutlichen Pyrit-Peaks

3.4.2 Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen von frisch gefälltem Eisensulfid

Abbildung 26 zeigt rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von frisch gefälltem Eisensulfid. In allen Bildern fallen die starken Zerklüftungen der Oberflächen auf, die für die hohe Reaktivität des Eisensulfids verantwortlich gemacht werden.

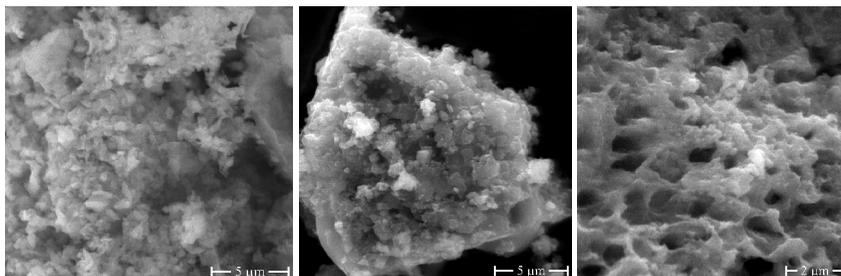


Abbildung 26 Drei Proben von frisch gefälltem Eisensulfid

Bei den untersuchten Partikeln handelt es sich um mikrometergroße Teilchen.

3.4.3 Raman Spektroskopie

Die Abbildung 27 zeigt in einer überlagerten Darstellung zwei typische Raman-Spektren, welche mit einem Mikro-Raman-Setup (Labram, Dilor) aufgenommen wurden. Das untere Spektrum zeigt die Aufnahme von Partikeln aus der Eisensulfid-Suspension, die unter Argonatmosphäre nach der Ammoniakbildungsreaktion aus dem Reaktionsgemisch entnommen wurde. Das obere Spektrum zeigt die Ramanaufnahme einer Pyritvergleichsprobe.

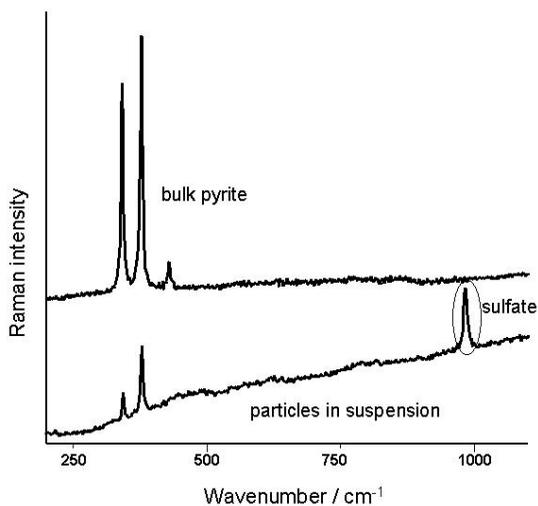


Abbildung 27 Raman-Spektrum von Eisensulfid-Partikeln aus der Ammoniakbildungsreaktion und einer Pyrit-Vergleichsprobe

Auch das Raman-Spektrum gibt einen Hinweis auf die Entstehung von Pyrit während der Ammoniakbildungsreaktion. Der Peak um 985 cm^{-1} kann eindeutig festem Sulfat zugeordnet werden. Die Banden bei ca. 350 cm^{-1} und ca. 400 cm^{-1} sind der S-S-Schwingung zuzuordnen.

4 Zusammenfassung und Schlussfolgerungen

Die im Rahmen des Projektes erzielten Ergebnisse leisten einen signifikanten Beitrag zur Aktivierung kleiner Moleküle und unterstützen die Hypothese der präbiotischen, terrestrischen Bildung von biologisch relevanten Molekülen. Die verhältnismäßig geringen Ausbeuten an Ammoniak müssen natürlich vor dem Hintergrund erdgeschichtlicher Größenordnungen der Reaktionszeiten und -volumen gesehen werden. Mit dieser Perspektive könnten in den „Urozeanen“ beträchtliche Mengen Ammoniaks entstanden sein. Das Hauptziel des Projektes, **molekularen Stickstoff unter milden Bedingungen an Eisensulfidoberflächen, bei Anwesenheit von Schwefelwasserstoff in wässriger Lösung zu aktivieren und Ammoniak zu gewinnen** (Reaktion (1)), konnte erreicht werden^[69]. Dabei wurde das moderate, aber noch genügend starke Reduktionspotential der Reaktion (7) genutzt. Gestützt werden die Ergebnisse durch thermodynamische Rechnungen von *K. Nomura et al.*^[70]. Es wird davon ausgegangen, dass die Oberfläche des frisch gefällten Eisensulfides eine Bibliothek verschiedener Eisen/Schwefel-Cluster aufweist, von denen einige dergestalt "maßgeschneidert" sind, dass sie molekularen Stickstoff komplexieren, aktivieren und reduzieren können. Da die sehr hohe Bindungsenergie und Aktivierungsenthalpie des Stickstoffmoleküls sowie die vermutlich geringe Anzahl geeigneter Aktivierungszentren bei milden Reaktionsbedingungen nur sehr kleine Ausbeuten an Ammoniak erwarten lassen, wurden die Reaktionen in einer pilot-plant-Apparatur durchgeführt. Der zweifelsfreie Nachweis, dass tatsächlich Ammoniak bei diesen Umsetzungen entstand und nicht als Verunreinigung eingeführt wurde, erfolgte mit ¹⁵N-angereicherter, molekularem Stickstoff. Der Nachweis von Pyrit nach der Stickstofffixierungsreaktion unterstützt die angenommene Reaktionsgleichung (1).

Da es, wie beschrieben, eine Verwandtschaft zwischen der rezenten Fe-only-Nitrogenase und unserer Reaktion gibt und des weiteren die gewählten Reaktionsbedingungen - wie Gaszusammensetzung, Temperatur, Oberflächen - vergleichbar sind mit denen, wie sie nach dem gegenwärtigen Kenntnisstand auf der Uerde geherrscht haben könnten, liegt die These nahe, die in diesem Bericht beschriebene Ammoniak-Synthese als ein Modell für ein mögliches präbiotisches „Nitrogenase“-System zu betrachten. Dieses läßt sich sinnfälligerweise in die Theorie des chemoautotrophen Ursprungs des Lebens einordnen.

5 Ausblicke

Die in der Arbeit vorgestellten Experimente haben viele neue, interessante Fragestellungen und Ansätze für weitere Projekte eröffnet. Folgende Forschungsschwerpunkte könnten im Vordergrund stehen:

Zwar konnte, wie oben gezeigt, phänomenologisch die Entstehung von Ammoniak nachgewiesen werden, doch gelang es mit den hier zur Verfügung stehenden Methoden und Einrichtungen nicht, eine Vorstellung über den Mechanismus der Reaktion zu entwickeln. Die primäre Herausforderung läge in der Isolierung der aktiven Spezies. Da das beschriebene System vermutlich eine große „Bibliothek“ an Reaktionszentren auf der Oberfläche enthält, und die Umsetzung wahrscheinlich aber nur an wenigen Zentren verläuft, sollte sich eine Isolierung und detailliertere Vermessung als besonders schwierig gestalten. Ein erster Ansatz wäre, genauere Kenntnisse über das Bindungsverhalten des Stickstoff-Moleküls an der Eisensulfid-Oberfläche zu gewinnen. Dazu könnten Raman-spektroskopische Untersuchungen an geeigneten Eisensulfidphasen unter erhöhtem Stickstoffdruck in einer Druckzelle erfolgen. In einem analogen Experiment könnte die Eisensulfid-Oberfläche unter Druck mit Stickstoff und Schwefelwasserstoff belegt und eine mögliche Reaktion spektroskopisch verfolgt werden. Damit wären, bei hinreichendem Zeitkapital, Messungen zur Kinetik der Reaktion erreichbar.

Auch der Einsatz von Mössbauer-Spektrometrie und Neutronenbeugung bzw. Synchrotronstrahlung sollte erwogen werden. Begleitet könnten diese Untersuchungen von einer theoretischen Modellierung, die auch Entscheidungshilfen für experimentelle Geometrien geben kann. Mit weitaus weniger Aufwand durchführbar wären folgende Versuche, die sich unmittelbar an die erzielten Ergebnisse anschließen:

- (i) Eine Untersuchung der Isotopenverteilung im erhaltenen Ammoniak bei equilibriertem N_2 .
- (ii) Weitere Photoreaktionen im geschlossenen System mit einer Bilanzierung der Stoffflüsse.
- (iii) Reaktionen unter Verwendung von FeS/Mo und Homocitrat/Citrat oder Tartrat.

Außerdem könnte in weiteren Untersuchungen von Interesse sein, die Aktivitäten von verschiedenen strukturierten Eisensulfid-Oberflächen gegenüber molekularem Stickstoff zu prüfen. So sollte die Technik zur Herstellung von Eisensulfid-Nano- und Mikropartikeln in inversen Micellen verfeinert und eine Methode entwickelt werden, Eisensulfid-Phasen auf Redox- bzw. Photo-inaktivem Trägermaterial aufzubringen. Zuletzt erwähnte Materialien ließen sich durch Fällung von Eisensulfid oder durch

Synthese an der Trägeroberfläche für die Verwendung im Wirbelschichtreaktor herstellen.

In Hinblick auf Nachhaltigkeit könnte das bisherige Reaktionsspektrum des Redoxsystems FeS/FeS_2 ausgeweitet werden. Es bietet sich aufgrund der Umweltverträglichkeit von Eisensulfiden an, diese für Reduktionen in der anorganischen und organischen Chemie einzusetzen.

6 Literatur

- [1] Wächtershäuser,G. (1988)
Before enzymes and templates: theory of surface metabolism.
Microbiol. Rev., **52**, 452-484.
- [2] Wächtershäuser,G. (1992)
Groundworks for an evolutionary biochemistry: the iron-sulphur world.
Prog. Biophys. Mol. Biol., **58**, 85-201.
- [3] Appl,M. (1999)
Ammonia : Principles and Industrial Practice. Weinheim, New York.
- [4] Smith,B.E. (2002)
Nitrogenase reveals its inner secrets.
Science, **297**, 1654-1655.
- [5] Einsle,O., Tezcan,F.A., Andrade,S.L.A., Schmid,B., Yoshida,M.,
Howard,J.B. & Rees,D.C. (2002)
Nitrogenase MoFe-protein at 1.16 angstrom resolution: A central ligand in
the FeMo-cofactor.
Science, **297**, 1696-1700.
- [6] Bada,J.L. & Lazcano,A. (2003)
Perceptions of science: Prebiotic soup-revisiting the Miller experiment.
Science, **300**, 745-746.
- [7] Wöhler,F. (1928)
Ann. Physik, **12**, 253.
- [8] Strecker,A. (1850)
Liebigs Ann. Chim., **75**, 27-31.
- [9] Oparin,A.I. (1938)
The Origin of Life. MacMillan, New York.
- [10] Löb,W. (1913)
Ber. Dtsch. Chem. Ges., **46**, 684.
- [11] Miller,S.L. (1953)
Science, **117**, 528.
- [12] Huber,C. & Wächtershäuser,G. (1997)
Activated acetic acid by carbon fixation on (Fe,Ni)S under primordial
conditions.
Science, **276**, 245-247.
- [13] Miyakawa,S., Yamanashi,H., Kobayashi,K., Cleaves,H.J. & Miller,S.L.
(2002)

- Prebiotic synthesis from CO atmospheres: implications for the origins of life.
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., **99**, 14628-14631.
- [14] Kasting, J.F. (1993)
Earth's early atmosphere.
Science, **259**, 920-926.
- [15] Farquhar, J., Wing, B.A., McKeegan, K.D., Harris, J.W., Cartigny, P. & Thiemens, M.H. (2002)
Mass-independent sulfur of inclusions in diamond and sulfur recycling on early Earth.
Science, **298**, 2369-2372.
- [16] Kasting, J.F. & Ackerman, T.P. (1986)
Climatic consequences of very high carbon dioxide levels in the earth's early atmosphere.
Science, **234**, 1383-1385.
- [17] Kim, J. & Rees, D.C. (1992)
Structural models for the metal centers in the nitrogenase molybdenum-iron protein.
Science, **257**, 1677-1682.
- [18] Kim, J., Woo, D. & Rees, D.C. (1993)
X-ray crystal structure of the nitrogenase molybdenum-iron protein from *Clostridium pasteurianum* at 3.0-Å resolution.
Biochemistry, **32**, 7104-7115.
- [19] Kim, J. & Rees, D.C. (1994)
Nitrogenase and biological nitrogen-fixation.
Biochemistry, **33**, 389-397.
- [20] Howard, J.B. & Rees, D.C. (1996)
Structural basis of biological nitrogen fixation.
Chem. Rev., **96**, 2965-2982.
- [21] Barriere, F. (2003)
Modeling of the molybdenum center in the nitrogenase FeMo-cofactor.
Coord. Chem. Rev., **236**, 71-89.
- [22] Eady, R.R. (2003)
Current status of structure function relationships of vanadium nitrogenase.
Coord. Chem. Rev., **237**, 23-30.
- [23] Burgess, B.K. & Lowe, D.J. (1996)
Mechanism of Molybdenum Nitrogenase.
Chemical Reviews (Washington, DC, United States), **96**, 2983-3011.
- [24] Sellmann, D. & Sutter, J. (1997)

- In quest of competitive catalysts for nitrogenases and other metal sulfur enzymes.
Acc. Chem. Res., **30**, 460-469.
- [25] Sellmann, D., Utz, J., Blum, N. & Heinemann, F.W. (1999)
On the function of nitrogenase FeMo cofactors and competitive catalysts: chemical principles, structural blue-prints, and the relevance of iron sulfur complexes for N₂ fixation.
Coord. Chem. Rev., **192**, 607-627.
- [26] Chatt, J., Dilworth, J.R. & Richards, R.L. (1978)
Recent advances in the chemistry of nitrogen fixation.
Chemical Reviews (Washington, DC, United States), **78**, 589-625.
- [27] Sellmann, D., Kaeppeler, J., Moll, M. & Knoch, F. (1993)
Transition metal complexes with sulfur ligands. 95. Diazene, hydrazine, ammine and azido complexes with sulfur dominated [Ru(PPH₃)(^tbuS₄')] fragments (^tbuS₄'²⁻ = 1,2-bis(2-mercapto-3,5-di-tert-butylphenylthio)ethanato (2-)).
Inorg. Chem., **32** [6], 960-964.
- [28] Sellmann, D. (1997)
Challenges of enzymatic N₂ fixation: the chemistry of nitrogen, hydrogen, and nitrogen hydrides in the coordination sphere of transition-metal sulfur complexes.
New J. Chem., **21**, 681-689.
- [29] Sellmann, D. & Fürsattel, A. (1999)
Modeling a nitrogenase key reaction: the N₂-dependent HD formation by D₂/H⁺ exchange.
Angewandte Chemie, International Edition, **38**, 2023-2026.
- [30] Sellmann, D., Blum, D.C.F. & Heinemann, F.W. (2002)
Transition metal complexes with sulfur ligands. Part CLV. Structural and spectroscopic characterization of hydrogen bridge diastereomers of [m-N₂H₂{Fe(PR₃)(^ttpS₄')}]₂ diazene complexes (^ttpS₄'²⁻ = 1,2-bis(2-mercaptophenylthio)phenylene(2-)).
Inorg. Chim. Acta, **337**, 1-10.
- [31] Coucouvanis, D., Han, J. & Moon, N. (2002)
J. Am. Chem. Soc., **124**, 216-224.
- [32] Reiher, M., Salomon, O., Sellmann, D. & Hess, B.A. (2001)
Stabilization of Diazene in Iron Sulfur Complexes Relevant for Nitrogenase Activity, Part II. Dinuclear diazene iron and ruthenium complexes as models for studying nitrogenase activity.
Chem. Eur. J., **7**, 5195-5202.
- [33] Yandulov, D.V. & Schrock, R.R. (2003)

- Catalytic Reduction of Dinitrogen to Ammonia at a Single Molybdenum Center.
Science, **301**, 76-78.
- [34] Nishibayashi, Y., Iwai, S. & Hidai, M. (1998)
Bimetallic system for nitrogen fixation: ruthenium-assisted protonation of coordinated N₂ on tungsten with H₂.
Science, **279**, 540-542.
- [35] Nishibayashi, Y., Iwai, S. & Hidai, M. (1998)
A Model for Protonation of Dinitrogen by Nitrogenase: Protonation of Coordinated Dinitrogen on Tungsten with Hydrosulfido-Bridged Dinuclear Complexes.
J. Am. Chem. Soc., **120**, 10559-10560.
- [36] Laplaza, C.E. & Cummins, C.C. (1995)
Dinitrogen cleavage by a three-coordinate molybdenum(III) complex.
Science (Washington, D. C.), **268**, 861-863.
- [37] Fryzuk, M.D., Love, J.B., Rettig, S.J. & Young, V.G. (1997)
Transformation of coordinated dinitrogen by reaction with dihydrogen and primary silanes.
Science, **275**, 1445-1447.
- [38] Rusina, O., Eremenko, A., Frank, G., Strunk, H.P. & Kisch, H. (2001)
Nitrogen photofixation at nanostructured iron titanate films.
Angew. Chem., Int. Ed. Engl., **40**, 3993-3995.
- [39] Schoonen, M.A.A. & Xu, Y. (2001)
Nitrogen reduction under hydrothermal vent conditions: Implications for the prebiotic synthesis of C-H-O-N compounds.
Astrobiology, **1**, 133-142.
- [40] Weigand, W., Kreisel, G., Kaessbohrer, J., Sammler, M. & Grunert, R. (1998)
Procedure for the production of ammonia.
Friedrich-Schiller-Universität Jena, Germany. 98-19846242[19846242], 4. 2000. DE. *Patent*.
- [41] Schrauzer, G.N. & Guth, T.D. (1976)
Hydrogen evolving systems. 1. The formation of molecular hydrogen from aqueous suspensions of iron(II) hydroxide and reactions with reducible substrates, including molecular nitrogen.
J. Am. Chem. Soc., **98**, 3508-3513.
- [42] Bazhenova, T.A. & Shilov, A.E. (1995)
Nitrogen-Fixation in Solution.
Coord. Chem. Rev., **144**, 69-145.
- [43] Rao, N.N., Dube, S., Manjubala & Natarajan, P. (1994)

- Photocatalytic reduction of nitrogen over (Fe, Ru or Os)/TiO₂ catalysts.
Applied Catalysis, B: Environmental, **5**, 33-42.
- [44] Brandes, J.A., Boctor, N.Z., Cody, G.D., Cooper, B.A., Hazen, R.M. & Yoder, H.S. (1998)
Abiotic nitrogen reduction on the early Earth.
Nature, **395**, 365-367.
- [45] Smith, J.M., Lachicotte, R.J., Pittard, K.A., Cundari, T.R., Lukat-Rodgers, G., Rodgers, K.R. & Holland, P.L. (2001)
Stepwise reduction of dinitrogen bond order by a low-coordinate iron complex.
J. Am. Chem. Soc., **123**, 9222-9223.
- [46] Haber, F. (1909)
Ammonia.
[229126]. DE. *Patent*.
- [47] Jacobsen, C.J.H. (2000)
Novel class of ammonia synthesis catalysts.
Chem. Commun., 1057-1058.
- [48] Hidai, M. & Mizobe, Y. (1995)
Recent Advances in the Chemistry of Dinitrogen Complexes.
Chemical Reviews, **95**, 1115-1133.
- [49] Ertl, G. (1991)
Catalytic Ammonia Synthesis (Jennings and J.R.), Plenum Press, New York.
- [50] Schoonen, M.A.A. & Barnes, H.L. (1991)
Reactions forming pyrite and marcasite from solution: I. Nucleation of iron disulfide below 100 DegC.
Geochim. Cosmochim. Acta, **55**, 1495-1504.
- [51] Schoonen, M.A.A. & Barnes, H.L. (1991)
Reactions forming pyrite and marcasite from solution: II. Via iron monosulfide precursors below 100 DegC.
Geochim. Cosmochim. Acta, **55**, 1505-1514.
- [52] Schoonen, M.A.A. & Barnes, H.L. (1991)
Mechanisms of pyrite and marcasite formation from solution: III. Hydrothermal processes.
Geochim. Cosmochim. Acta, **55**, 3491-3504.
- [53] Rickard, D. (1997)
Kinetics of pyrite formation by the H₂S oxidation of iron (II) monosulfide in aqueous solutions between 25 and 125 DegC: the rate equation.
Geochim. Cosmochim. Acta, **61**, 115-134.

- [54] Lianos,P. & Thomas,J.K. (1986)
Cadmium-sulfide of small dimensions produced in inverted micelles.
Chemical Physics Letters, **125**, 299-302.
- [55] Lianos,P. & Thomas,J.K. (1987)
Small cds particles in inverted micelles.
Journal of Colloid and Interface Science, **117**, 505-512.
- [56] Motte,L., Petit,C., Boulanger,L., Lixon,P. & Pileni,M.P. (1992)
Synthesis of cadmium sulfide in situ in cadmium bis(2-ethylhexyl) sulfosuccinate reverse micelle: polydispersity and photochemical reaction.
Langmuir, **8**, 1049-1053.
- [57] Motte,L., Billoudet,F. & Pileni,M.P. (1995)
Self-assembled monolayer of nanosized particles differing by their sizes.
Journal of Physical Chemistry, **99**, 16425-16429.
- [58] Pileni,M.P., Lisiecki,I., Motte,L. & Petit,C. (1992)
Nanometer particles synthesis in reverse micelles - influence of the size and the surface on the reactivity.
Research on Chemical Intermediates, **17**, 101-113.
- [59] Hirai,T., Bando,Y. & Komasaawa,I. (2002)
Immobilization of CdS nanoparticles formed in reverse micelles onto alumina particles and their photocatalytic properties.
J. Phys. Chem. B, **106**, 8967-8970.
- [60] Chatterjee,M., Patra,A. & Brinker,J. (2001)
Cadmium sulfide aggregates through reverse micelles.
Journal of the American Ceramic Society, **84**, 1439-1444.
- [61] Butler,E.C. & Hayes,K.F. (2002)
Reductive transformation of halogenated aliphatic pollutants by iron sulfide.
ACS Symposium Series, **806**, 113-129.
- [62] Wilcoxon,J.P., Newcomer,P.P. & Samara,G.A. (1996)
Strong quantum confinement effects in semiconductors: FeS₂ nanoclusters.
Solid State Communications, **98**, 581-585.
- [63] Chadha,A., Sharma,R.K., Stinespring,C.D. & Dadyburjor,D.B. (1996)
Iron Sulfide Catalysts for Coal Liquefaction Prepared Using a Micellar Technique.
Industrial & Engineering Chemistry Research, **35**, 2916-2919.
- [64] Li,J. & Nazar,L.F. (2000)
Chem. Commun., 1749.
- [65] Brand,W.A. (1996)
High precision isotope ratio monitoring techniques in mass spectrometry.

- J. MassSpectrom.*, **31**, 225-235.
- [66] Werner, R.A., Bruch, B.A. & Brand, W.A. (1999)
ConFlo III - An interface for high precision delta ¹³C and delta ¹⁵N analysis with an extended dynamic range.
Rapid Commun. Mass Spectrom., **13**, 1237-1241.
- [67] Werner, R.A. & Brand, W.A. (2001)
Referencing strategies and techniques in stable isotope ratio analysis.
Rapid Commun. Mass Spectrom., **15**, 501-519.
- [68] Werner, R.A. & Schmidt, H.L. (2002)
The in vivo nitrogen isotope discrimination among organic plant compounds.
Phytochem., **61**, 465-484.
- [69] Dörr, M., Kässbohrer, J., Grunert, R., Kreisel, G., Brand, W.A., Werner, R.A., Geilmann, H., Apfel, C., Robl, C. & Weigand, W. (2003)
A possible prebiotic formation of ammonia from dinitrogen on iron sulfide surfaces.
Angew. Chem., Int. Ed. Engl., **42**, 1540-1543.
- [70] Nomura, K. & Schrock, R.R. (1996)
Synthesis of Vanadium(III), -(IV), and -(V) Complexes That Contain the Pentafluorophenyl-Substituted Triamidoamine Ligand [(C₆F₅NCH₂CH₂)₃N]₃-.
Eur. J. Inorg. Chem., **35**, 3695-3701.

7 Verzeichnisse

7.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Röntgenographische Aufnahme der Nitrogenase (Quelle:PDB - 1M1N, die Darstellung wurde mit dem dortigen Web-Frontend als „Bändermodell“ erzeugt)	21
Abbildung 2 oben: Schema der FeMo-Nitrogenase; unten: wahrscheinliche Elektronenübertragungskette	[21] 22
Abbildung 3 Struktur des FeMo-Cofaktors	[21] 23
Abbildung 4 Der Oxidations- und Reduktionszyklus des Fe-Proteins der Nitrogenase	[22]. 24
Abbildung 5 Chatt-Zyklus	[27] 26
Abbildung 6 Stabilisierung von trans-Diazen durch zwei Eisen-Schwefel Fragmente und spezifische NH-S-Wasserstoffbindungen	[21] 27
Abbildung 7 Diazen	27
Abbildung 8 Schrock-Zyklus: Distickstoffreduktion an Mo oder W Metallzentrum mit hoher Oxidationsstufe	[21] 28
Abbildung 9 neuer Schrock-Zyklus	[34] 29
Abbildung 10 Katalytischer Zyklus der Reduktion von Distickstoff durch Mo-Nitrogenase (von Klebsiella pneumoniae); in ihr ist vor der Bindung des Stickstoffs Wasserstoff im aktiven Zentrum koordiniert. E0 = Ausgangszustand des MoFe-Proteins.	[22] 33
Abbildung 11 Bis(2-ethylhexyl)sulfosuccinat-Natriumsalz= Dihexylnatriumsuccinat (AOT)	36
Abbildung 12 Skizze zur Entstehung der Nanopartikel: (a) n-Heptan mit AOT; (b) Zusatz von Wasser → inverse Micellen; (c) Zusatz von Fe ²⁺ -Salz; (d) H ₂ S Einleitung → FeS Nanopartikel	37
Abbildung 13 Schematischer Aufbau der Stickstofffixierungsapparatur	44
Abbildung 14 Hauptsteuerfenster des Programms und Teil des Programms in graphischer Programmiersprache HP-VEE	46
Abbildung 15 MERCK-Aquaquant-Farbschnelltest	51
Abbildung 16 Schematischer Aufbau einer Apparatur zur Bestimmung des Stickstoffisotopenverhältnisses	58
Abbildung 17 IRMS-Meßsequenz	59
Abbildung 18 Mehrstufige Kalibration der IRMS	60
Abbildung 19 UV-Belichtungsapparatur	63
Abbildung 20 FeS -Teilchen: (links) Nanopartikel (mitte) ein Nanopartikel (rechts) Vergleichspartikel aus gewöhnlicher FeS-Fällung	67
Abbildung 21 TEM-Aufnahme eines FeS-Nanopartikels	67
Abbildung 22 EDX-Spektrum eines Eisensulfid-Mikropartikels	68
Abbildung 23 Maximalabschätzung der Reaktandenkontamination an Ammoniak im Reaktionsgemisch: (i) Stickstoff mit 0.001% NH ₃ -Kontamination und (ii) mit 0.0001% NH ₃ -Kontamination; daraus resultieren die beiden Gesamtsummen 13.37 mg NH ₃ bzw. nur 6.54 mg NH ₃	74
Abbildung 24 Röntgenpulverdiffraktogramm von frisch gefälltem Eisensulfid mit FeK α -Strahlung.	75
Abbildung 25 Bragg-Reflexion eines Röntgenpulverdiffraktogramms (FeK α -Strahlung) von Eisensulfid, das in der Ammoniakbildungsreaktion verwendet wurde, mit deutlichen Pyrit-Peaks	76
Abbildung 26 Drei Proben von frisch gefälltem Eisensulfid	77
Abbildung 27 Raman-Spektrum von Eisensulfid-Partikeln aus der Ammoniakbildungsreaktion und einer Pyrit-Vergleichsprobe	78
Abbildung 28 Ammoniak Nachweisreaktion (nach MERCK)	94
Abbildung 29 Hardware-Schnittstellen	100

Abbildung 30 NH3Ctrl - Hauptfenster	102
Abbildung 31 NH3Ctrl-Vee - Hauptprogramm	103
Abbildung 32 NH3Ctrl - Programmstatus-Modul	104
Abbildung 33 NH3Ctrl – Gasfluss-Steuerung – Input-Teil	105
Abbildung 34 NH3Ctrl – Gasfluss-Modul – Output-Teil	106
Abbildung 35 NN3Ctrl - Pumpensteuerungsmodul - Bedienfenster	107
Abbildung 36 NH3Ctrl - Pumpensteuerungsmodul - Initialisierung	108
Abbildung 37 NH3Ctrl - Pumpensteuerungsmodul - Output	109
Abbildung 38 NH3Ctrl - pH-Steuerung - Benutzerfenster	110
Abbildung 39 NH3Ctrl – pH-Kalibration - Benutzerfenster	111
Abbildung 40 Berechnung des pH-Wertes aus der aktuellen pH-Meterspannung und einer durch Kalibration erzeugten Zweipunktgeraden	112
Abbildung 41 NH3Ctrl - pH-Steuerung - Initialisierung	113
Abbildung 42 NH3Ctrl – pH-Steuerung - Hauptprogrammschleife	114
Abbildung 43 NH3Ctrl - pH-Steuerung - Entscheidungskern	115
Abbildung 44 NH3Ctrl - pH-Steuerung - PID-Regelung	116
Abbildung 45 NH3Ctrl – Dokumentationsmodul - Kopf	117
Abbildung 46 NH3Ctrl - Dokumentationsmodul - Tabellenfüllung und Speicherung	118

7.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Übersicht repräsentativer Stickstofffixierungsexperimente im "pilot-plant"-Maßstab 71

7.3 Verzeichnis eigener Publikationen

- [1] Dörr,M., Kässbohrer,J., Grunert,R., Kreisel,G., Brand,W.A., Werner,R.A., Geilmann,H., Apfel,C., Robl,C. & Weigand,W. (2003)
A possible prebiotic formation of ammonia from dinitrogen on iron sulfide surfaces.
Angew. Chem., Int. Ed. Engl., **42**, 1540-1543.
- [2] Dörr,M., Kreisel,G., Völksch, G. & Weigand,W. (2003)
Herstellung von Eisen(II)-sulfid-Nano- und Mikropartikeln in inversen Micellen.
Z. Anorg. Allg. Chem., **629**, 1113-1115.
- [3] Kreisel,G., Wolf, C., Weigand,W. & Dörr,M. (2003)
Ammoniak aus Stickstoff unter präbiotischen Bedingungen.
Chemie in unserer Zeit, **37**, 306-313.
- [4] W. Weigand, M. Dörr C. Robl, G. Kreisel, R. Grunert, J. Käßbohrer, W. Brand, R. Werner, J. Popp, N. Tarcea (2002)
Formation of Ammonia from Dinitrogen under Primordial Conditions.
Proceedings of the Second European Workshop on Exo/Astrobiology, Graz, 2009

7.4 Vorträge

[1] M.Dörr

„Aktivierung kleiner Moleküle an Übergangsmetall-Schwefel-Verbindungen“.

Vortrag auf der SFB 436 Tagung; Thalbürgel; 27.4.2001

[2] M.Dörr, C. Wolf

„Reduktion an Metallsulfiden“.

Vortrag auf der SFB 436 Tagung; Thalbürgel; 26.4.2002

[3] M. Dörr

„Eine mögliche präbiotische Bildung von Ammoniak aus molekularem Stickstoff auf Eisensulfidoberflächen“.

Vortrag im Rahmen des 1. Mitteldeutschen Anorganiker Nachwuchs Symposiums (MANS); Chemnitz; 22.9.2003

7.5 Poster

[1] C. Wolf, G. Kreisel, M. Dörr, W. Weigand

„Primordial Formation of Ammonia from Dinitrogen on Iron Sulfide Surface“.

Posterbeitrag im Rahmen der Konferenz „Fe/S proteins – Biogenesis, Structure, Function, Pathogenesis and Evolution“, Philipps-Universität Marburg, 11.-14. September 2002

[2] W. Weigand, M. Dörr, G. Kreisel, C. Wolf

„Primordial Formation of Ammonia from Dinitrogen on Iron Sulfide Surface“.

Posterbeitrag im Rahmen des Second European Workshop on Exo/Astrobiology, Graz, 16.-19. September 2002

8 Index

δ -Wert 53, 97

A

Aminosäuren 11, 13, 15, 18
 Ammoniumsulfat 49, 53ff., 61, 99
 AOT 35, 62, 65
 autotroph 13
 Azotobacter 12, 20

B

Berthelot-Reaktion 47
 black smoker 16

C

Chatt 24ff.
 chemoautotroph 12ff., 16, 80
 CHN-Analysator 58
 Clostridium 20
 ConFlo 59f.

D

Dieisendiazin 26
 Dihexylnatriumsuccinat 35, 65
 Dünnschichtreaktor 64

E

EDX 67
 Eisen 11f., 15ff., 19, 26, 29, 64, 69, 79
 Eisen-Schwefel-Cluster 12
 Elektronenstrahlmikroanalyse 67, 69

F

Faraday-Becher 59
 Fe-Protein 20ff.
 FeMo-Cofaktor 19ff., 23f., 31
 FeMo-Nitrogenase 20, 23
 FeMo-Protein 12, 20ff.
 FeS-Cluster 37
 Flow-Controller 42, 45, 101, 106

G

Gasreiniger 42, 73

Greigit 33

H

Haber-Bosch 30
 heterotroph 13
 HP-Vee 42, 45f., 101, 111

I

inversen Mizellen 65, 93
 IRMS 10, 41, 49, 52, 54ff., 58, 60f., 97
 Isotopenfraktionierung 17, 53
 Isotopenmarkierungsversuch 47
 Isotopenmarkierung 48

K

Kohlenstofffixierungszyklus 15

L

leguminosarum Rhizobium 19
 Löb 13

M

Mackinawit 33
 MgATP 21ff.
 Miller 13f., 17
 Mizelle 65, 93
 Molybdän 19f., 22, 26ff.

N

N₂-Aktivierung 19, 64
 Nanopartikel 34f., 66, 67, 68
 Nitrogenase 1, 6f., 11, 12, 18ff., 22, 23f., 26, 28ff., 37, 79f., 83ff., 91, 120

O

Oxidationsrohr 58

P

P-Cluster 20f.
 pilot-plant 38f., 79

präbiotisch 1, 6, 11, 16, 37, 79f., 93
 Prozesssteuerung 40, 44f.
 Pumpensteuerung 45, 103
 Pyrit 14f., 33f., 41, 63, 76f., 79

R

Raman-Spektroskopie 41, 63
 Rasterelektronenmikroskopie 66, 68
 Reduktionsrohr 59
 Rhizobium 19
 Röntgenkristallstruktur 23
 Röntgenpulverdiffraktometrie 41, 62, 66, 75
 RS-232 45, 101, 109

S

Schrock 26, 29
 Schwefel 11f., 15f., 24, 26, 35, 43,

49, 54, 56, 69, 72, 79, 81, 93f.
 Schwefelsäure 49, 54, 56, 72
 Sellmann 26, 29, 31

T

TEM 67
 Thioessigsäure 15
 Transmissions-Elektronenmikroskop 41,
 67

U

UV-Licht 29, 64, 75

W

Wächtershäuser 14f.

Z

Zitrat 15, 21

9 Appendix

9.1 Nachweisreaktion der verwendeten MERCK-Ammoniak Schnelltests

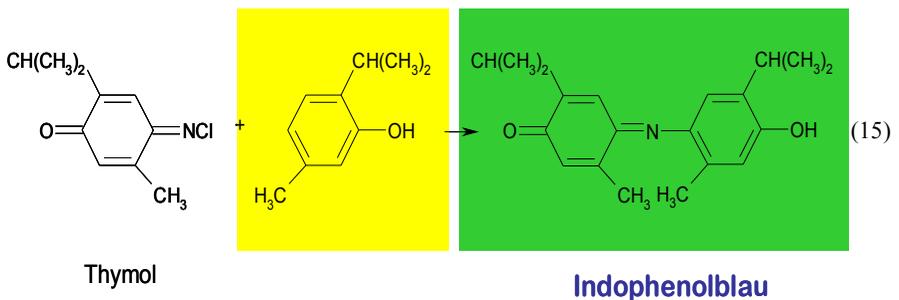
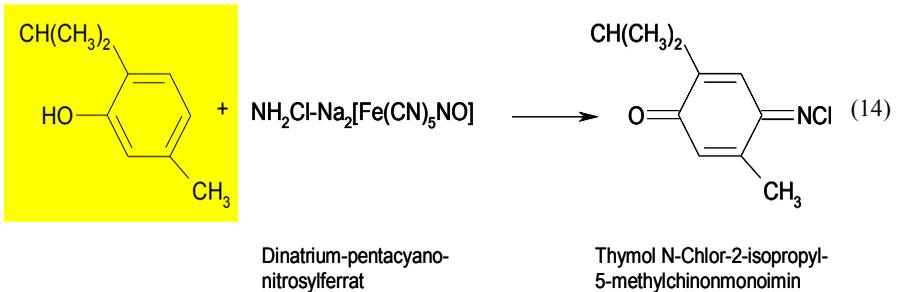
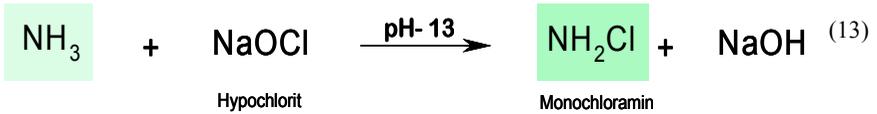


Abbildung 28 Ammoniak Nachweisreaktion (nach MERCK)

9.1.1 Methode

1. 10 ml einer Probelösung werden mit 300 μl einer auf den $^{29/28}\delta$ -Wert = 125,2 ‰ eingestellten $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Lösung (100 g/L) versetzt. Diese Lösung wird nun eingedampft und mit der IRMS-Methode vermessen. Aus der Abnahme des $^{28/29}\delta$ -Wertes (124,61 ‰) kann der Ammoniumgesamtgehalt von 3 mol FeS-Roh-Suspension abgeschätzt werden: 0,5 mg – 5 mg NH_4^+ .

9.2 Auswertung des Isotopenverdünnungsexperimentes

Der δ -Wert für $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ -Isotope ist definiert als:

$$\delta(^{15}\text{N})[\text{‰}] = \left(\frac{\left(\frac{c(^{15}\text{N})}{c(^{14}\text{N})} \right)_{\text{Probe}}}{\left(\frac{c(^{15}\text{N})}{c(^{14}\text{N})} \right)_{\text{Standard}}} - 1 \right) \cdot 1000 \quad (2)$$

wobei $c(^{14}\text{N})$ die Konzentration an ^{14}N und $c(^{15}\text{N})$ die Konzentration an ^{15}N ist.

$$\text{Mit } R(\text{Probe}) = \left(\frac{c(^{15}\text{N})}{c(^{14}\text{N})} \right)_{\text{Probe}} \quad (3)$$

$$\text{und } R(\text{Standard}) = \left(\frac{c(^{15}\text{N})}{c(^{14}\text{N})} \right)_{\text{Standard}} \quad (4)$$

ergibt sich für bekanntes $R(\text{Standard})$ nach Umformung der Gleichung (4) für das Isotopenverhältnis

$$R(\text{Probe}) = \left(\frac{\delta(^{15}\text{N})}{1000} + 1 \right) \cdot R(\text{Standard}) \quad (5)$$

Liegt eine Stoffmischung der Gesamtmasse $m_{\Sigma}(AA')$ mit Verbindungen vor, die sich nur in einem Isotop unterscheiden, so ergibt sich für die Einzelmassen der beiden

Stoffe, bei bekannten Isotopenverteilung $R_{A'A} = \left(\frac{c(A')}{c(A)} \right)$ und den Molmassen M_A

und $M_{A'}$ der beiden Isotopomere, für die Massen m_A und $m_{A'}$ der beiden einzelnen Verbindungen in der Mischung:

$$m_A = \frac{m_\Sigma(AA')}{1 + R_{A'A} \frac{M_{A'}}{M_A}} \quad (6)$$

$$m_{A'} = \frac{m_\Sigma(AA')}{1 + \frac{M_A}{M_{A'} R_{A'A}}} \quad (7)$$

Und für die Stoffmengen n_A und $n_{A'}$:

$$n_A = \frac{m_A}{M_A} \quad (8)$$

$$n_{A'} = \frac{m_{A'}}{M_{A'}} \quad (9)$$

Setzt man einer Lösung, die in Spuren eine unbekannte Menge eines Isotops hat, eine definierte Menge einer Isotopenmischung (mit bekannter Isotopenverteilung) zu, so erhält man aus der Veränderung der neuen Isotopenverteilung (und damit des Messwertes δ) die Stoffmenge an in der Probe unbekanntem Isotop.

Für die Versuche gilt:

Wir haben nach Beendigung eines Versuches die Gesamtmasse m_Σ , die der Masse der Mischung aus zwei Ammoniumsulfaten [$(^{15}\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $(^{14}\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$] entspricht, die einer Probelösung zugesetzt wird, und das bekannte Stickstoffisotopenverhältnis R_{IV} hat.

Zu bestimmen ist $m(^{14}\text{NH}_4^+)$.

Mit Gleichung (6) und (7) kann dann die jeweilige Masse des zugesetzten Ammoniumsulfates bestimmt werden; R_{IV} kann z.B. durch Messung des δ -Wertes mit Hilfe von Gleichung (5) bestimmt werden. Aus Gleichung (8) und (9) erhält man die Stoffmenge der zugesetzten Ammoniumsulfate. Unter der Annahme, dass sich die Menge an ^{15}N nicht ändert, kann nun aus dem gemessenen, veränderten

Isotopenverhältnis R_{gesamt} [wieder zugänglich aus dem $^{29/28}\delta$ -Wert der unbekannt Probe nach Zusatz mit Gleichung (5)] die gesamte Menge an ^{14}N in der Probe bestimmt werden:

$$n(^{14}\text{N}_{\text{gesamt}}) = n(^{15}\text{N}_{\text{Zusatz}})/R_{\text{gesamt}}$$

Die unbekannte Stoffmenge $n(^{14}\text{N}_{\text{Probe}})$ in der Probe ist dann

$$n(^{14}\text{N}_{\text{Probe}}) = n(^{14}\text{N}_{\text{gesamt}}) - n(^{14}\text{N}_{\text{Zusatz}}),$$

Für die Masse an ^{14}N -Ammonium in der Probe resultiert

$$m(^{14}\text{NH}_4^+, \text{Probe}) = n(^{14}\text{N}_{\text{Probe}}) M(^{14}\text{NH}_4^+)$$

$m(^{14}\text{NH}_4^+, \text{Probe})$ ist eine Abschätzung des in der Probe vorhandenen, unbekannt $^{14}\text{NH}_4^+$.

9.3 Analyse der Stickoxide in der Stickstoffisotopenmischung

Der Prüfbericht der *Firma I.U.T. GmbH* (Nr. 1039, vom 28.06.01), in dem die Stickstoffisotopenmischung auf Spuren von Stickoxiden untersucht wurde, ergab:

$$^{15}\text{NO} < 10 \text{ ppb}$$

$$^{15}\text{NO}_2 < 3 \text{ ppb}$$

$$^{14}\text{NO} < 10 \text{ ppb}$$

$$^{14}\text{NO}_2 < 3 \text{ ppb}$$

9.4 HP VEE 5.0 NH3Ctrl

Basierend auf dem von meinem Kollegen Dr. Johannes Käbbohrer entwickelten Modul „NH3ctl.vee“ wurde NH3Ctrl 1.3 programmiert. Die Neuprogrammierung und Erweiterung war notwendig, da zwei neue Steuerkarten in den Prozeßrechner der Stickstofffixierungsanlage eingebaut wurden und eine universellere Lösung angestrebt wurde.

Konzept, Hardware- und Benutzerschnittstellen, Algorithmen: Dipl. Chem. mark Dörr; zahlreiche Detaillösungen und Debugging: Dipl. Chem. Claudia Wolf.

Eine unter Microsoft Windows[®] lauffähige Demoversion befindet sich in der Anlage auf der CD-ROM. Vor dem Programmstart muß die HP-Vee-Runtime-Bibliothek installiert werden.

9.4.1 Hardwarekonfigurationsschema

Die Anlagensteuerung der Stickstofffixierungsapparatur basiert hardwareseitig auf :

1. Rechner (min. 200 MHz *Intel Pentium*[®], 64 MB RAM, 4GB Festplatte, *Microsoft WindowsME*[®])
2. *Meilhaus* RS-232 Steuerkarte ME 2600
3. *Meilhaus* A/D-D/A Steuerkarte ME 3000
4. 1 GasFlow-Controller *Bronkhorst* EL Flow Typ F-201C-FB-33V, 10 l/h
5. 1 GasFlow-Controller *Bronkhorst* EL Flow Typ F-201C-FB-33V, 400 l/min
6. Netzteil *Traco* ERK 70U-1515 für Flow-Controller
7. 2 Schlauchpumpen (*ISMATEC* Typ IP65)
8. pH-Meter (*Schott GmbH*) mit analogem Schreiber-Ausgang.

Das nachfolgende Schema verdeutlicht, wie die Geräte verbunden sind und die Art der Datenströme an den Hardwareschnittstellen:

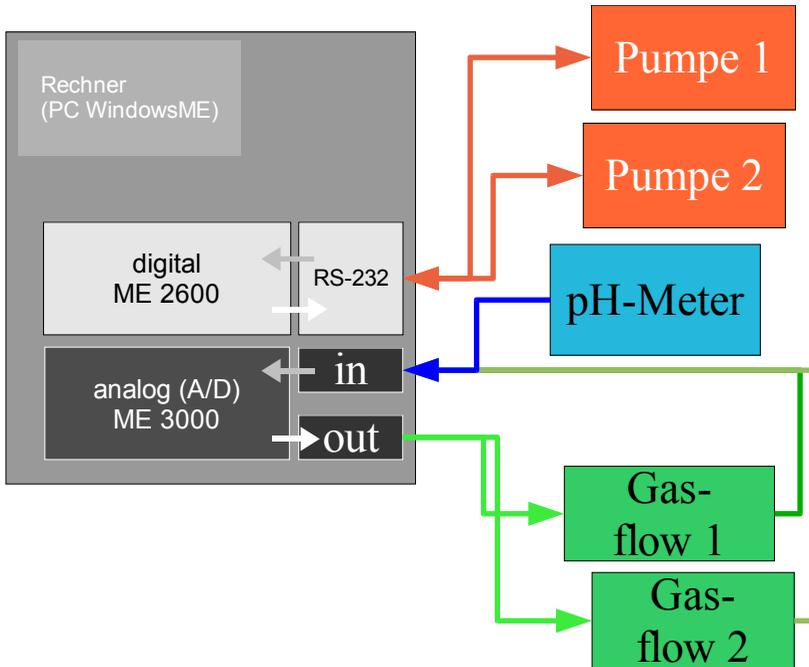


Abbildung 29 Hardware-Schnittstellen

9.4.2 Bedienungsanleitung

Obwohl bei der Programmierung viel Wert auf intuitive Benutzerführung gelegt und die Teile so gestaltete wurden, dass sie sich möglichst selbst erklären, folgt eine kurze Anleitung. Sie ist an den eingewiesenen Laien und fachkundigen Benutzer gerichtet und soll als Erinnerungsstütze dienen.

9.4.2.1 Programmstart

Das Programm heißt „NH3Ctrl“ und wird durch Doppelklick auf das "NH3Ctrl.vee"-Icon des Windows Desktops gestartet. (**Achtung: Die Excel-ActiveX-Schnittstelle „Microsoft Excel 9.0 Object Library“ muß in VEE eingeschaltet sein! s. Dokumentation der VEE-Excel-Schnittstelle**)

9.4.2.2 Erste Schritte

Bei erfolgreichem Programmstart öffnet sich zunächst ein Fenster für die Kalibration der pH-Elektrode. Hier kann jetzt die pH-Erfassung im Programm kalibriert werden. Achtung! Die pH-Kalibration im Programm hat nichts mit der Kalibration des pH-Meters zu tun - sie dient lediglich

der Übermittlung des richtigen pH-Wertes an den Rechner. Die pH-Elektrode muß zuvor mit den drei Kalibrationslösungen (4.01, 10.01, 7.0) kalibriert sein!

Nun wird in einer Prozedur, ähnlich der pH-Meter-Kalibration, das Programm kalibriert:

1. pH-Elektrode in Lösung pH 4.01 eintauchen und warten, bis der Spannungs-Wert konstant ist
2. Knopf „pH 4“ im Kalibrationsfenster drücken
3. pH-Elektrode in Lösung pH 10 eintauchen und warten, bis der Spannungs-Wert konstant ist
4. Knopf „pH 10“ im Kalibrationsfenster drücken
5. Kalibrationsfenster mit „Exit“ verlassen

Diese Kalibration wird nicht dauerhaft gespeichert, sondern muss bei jedem Programmstart neu durchgeführt werden. Dies ist auch sinnvoll, da ja auch der pH-Meter vor jeder Verwendung neu kalibriert werden muß. (Im Programm sind annähernd richtige Vorgabe-Werte integriert, so dass eine ungefähre pH-Messung auch ohne Kalibration möglich wäre).

Im Hintergrund startet Microsoft Excel® und beginnt die Prozessdaten alle 15 s aufzuzeichnen. Excel muß während der gesamten Versuchsdurchführung geöffnet bleiben (**bitte nicht schließen!!**), kann aber als verkleinertes Fenster im Hintergrund laufen.

Der Benutzer sieht nun die im weiteren beschriebenen Elemente des Hauptprogrammfensters:

- (1) Start- und Stop-Knopf
- (2) Programm-Informations-Knopf
- (3) Statusfenster
- (4) pH-Steuerungsmodul
- (5) Pumpensteuerungsmodul
- (6) und Gasstromsteuerungsmodul.

Die Funktionen der einzelnen Elemente wurden in 2.2.1, S.43 besprochen.

Beenden des Programms

Einfach auf den roten Knopf „Stop Program“ drücken.

9.4.3 Hauptfenster

Abbildung 30 zeigt das Hauptfenster des Programms NH3Ctrl 1.3, so wie es der Anwender nach dem erfolgreichen Programmstart vorfindet.

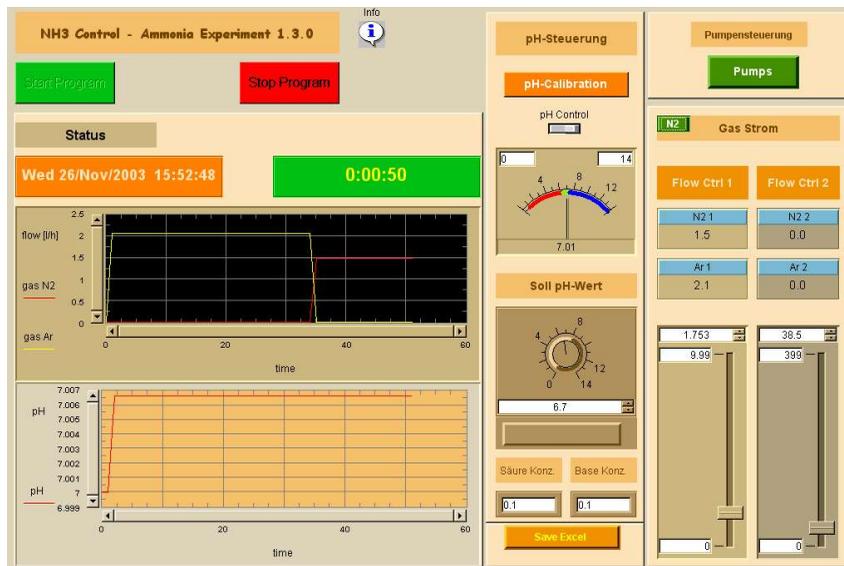


Abbildung 30 NH3Ctrl - Hauptfenster

Im Statusfenster kann neben der aktuellen Zeit und der Laufzeit des Versuchs der Wechsel der Gase und Ihre Strömungsgeschwindigkeit sowie der pH-Wert der Suspension abgelesen werden. Weitere Module bilden

- die pH-Steuerung (Mitte),
- die Pumpensteuerung (oben rechts)
- und die Gasflußsteuerung (rechts).

Aktuelle Informationen zum Programm können über den „Info“-Knopf abgerufen werden.

9.4.4 Programmaufbau

Hauptprogramm

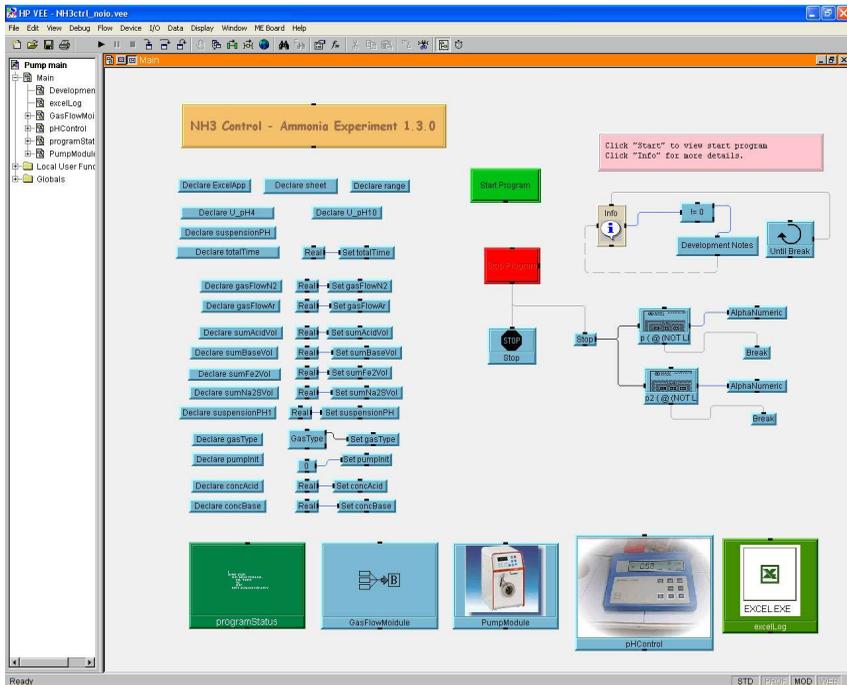


Abbildung31 NH3Ctrl-Vee - Hauptprogramm

Mit Titel, Start und Stop-Einheit, Benutzerinformationsteil und Deklarationsteil.

Die 5 Programmmodule – sind als User Objects realisiert und laufen als unabhängige Threads:

1. programStatus – Status des Programms
2. GasFlowModule – Gasfluß Steuerung
3. PumpModule - Pumpensteuerung
4. pHControl – pH-Kontrolle
5. excelLog - Dokumentation

9.4.5 Status des Programms

Anzeige der Gesamtlaufzeit, der aktuellen Zeit, der Gasflüsse und des pH-Wertes

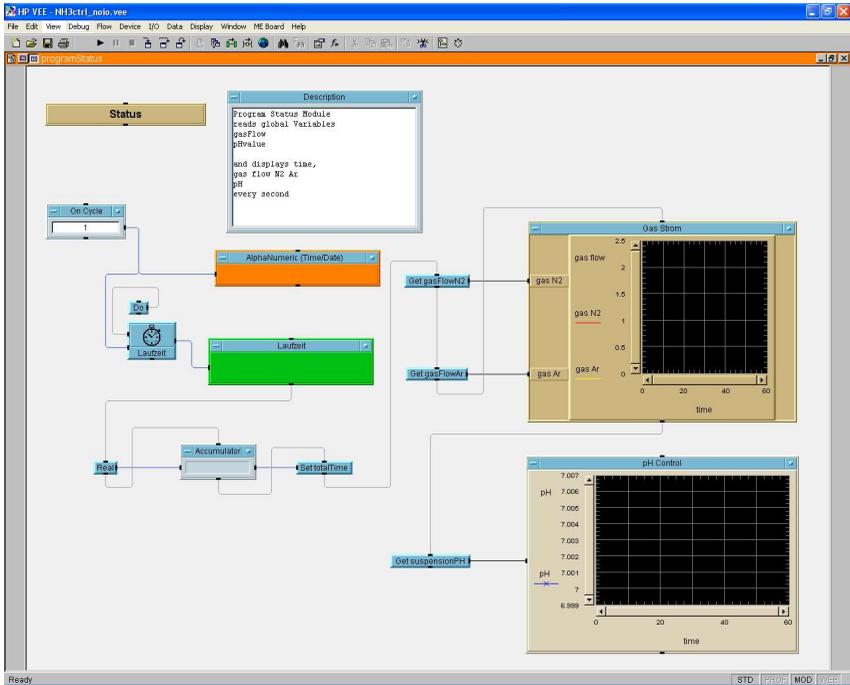


Abbildung 32 NH3Ctrl - Programmstatus-Modul

9.4.6 Gasfluß Modul

Ansteuerung zweier Flow-Controller zur definierten Dosierung des Inertgases bzw. Stickstoffs. Gasströme von 0.5 l/min bis 400 l/min können eingestellt werden.

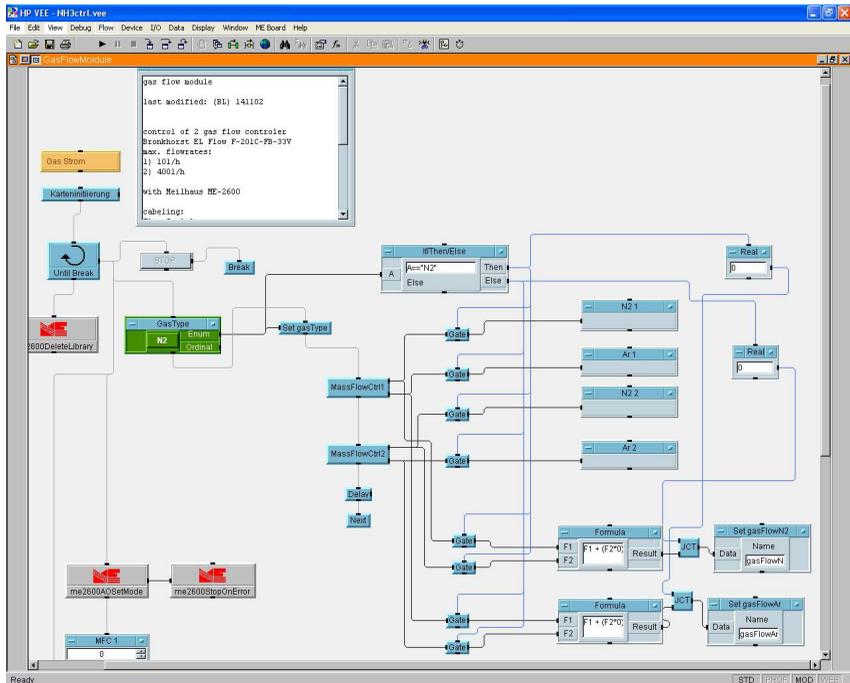


Abbildung 33 NH3Ctrl – Gasfluss-Steuerung – Input-Teil

Hier werden die aktuellen Gasströme von den Flow-Controllern gelesen.

9.4.7 Gasfluß output

Einstellung der Gasströme über Ausgabe von analogen Steuerspannungen über D/A-Wandler an die Flow-Controller.

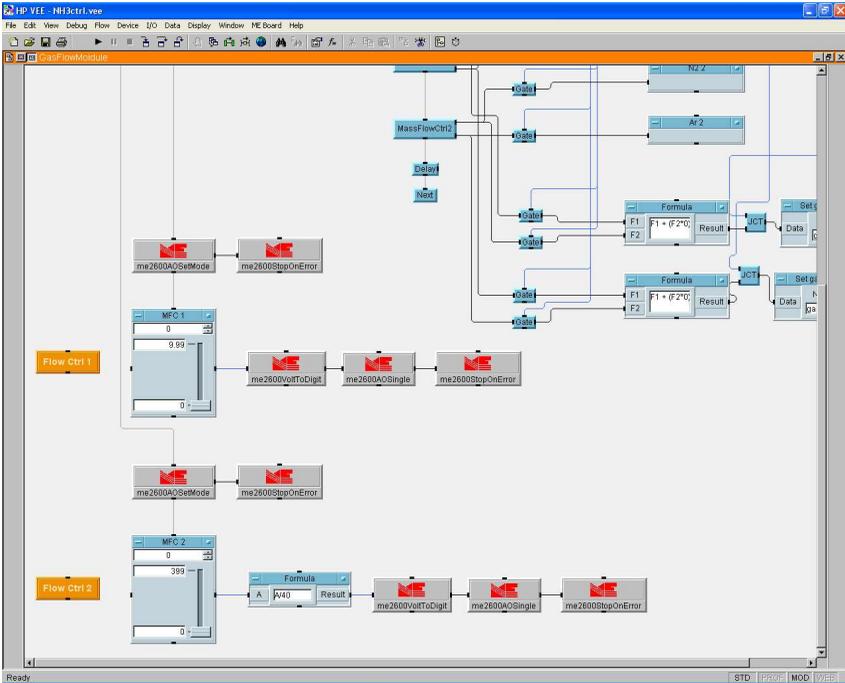


Abbildung 34 NH3Ctrl – Gasfluss-Modul – Output-Teil

9.4.8 Pumpenmodul

Ermöglicht die unabhängige Ansteuerung zweier Schlauchpumpen vom Typ *Ismatec* IP65 mittels serieller RS232-Schnittstelle. Dieses Modul erlaubt die Herstellung genau definierter Sulfidsuspensionen. Dies ist für die Reproduktion und Variation der Fällungsbedingungen notwendig.

Benutzerschnittstelle (Abbildung 35)

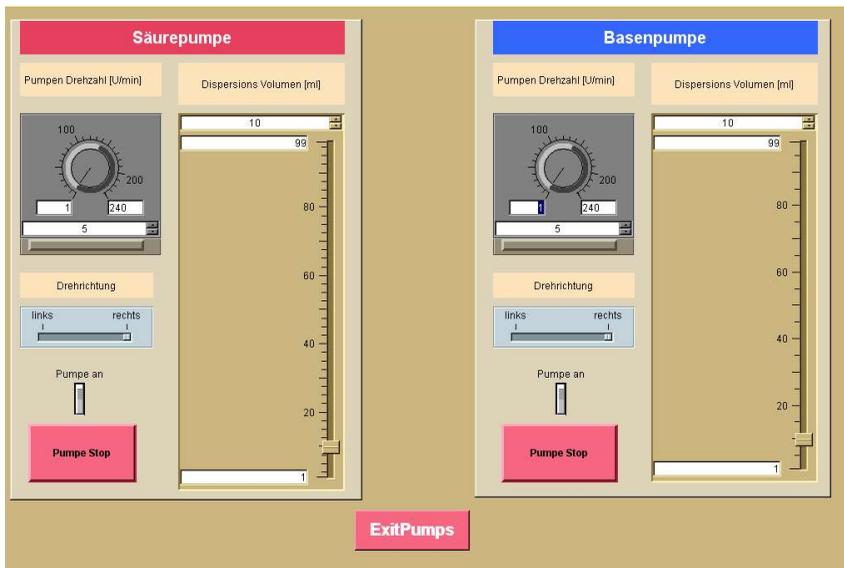


Abbildung 35 NN3Ctrl - Pumpensteuerungsmodul - Bedienfenster

9.4.9 Pumpenprogramm

Initialisierung der Pumpen mit RS-232-Steuerbefehlen (s. Handbuch der Schlauchpumpen).

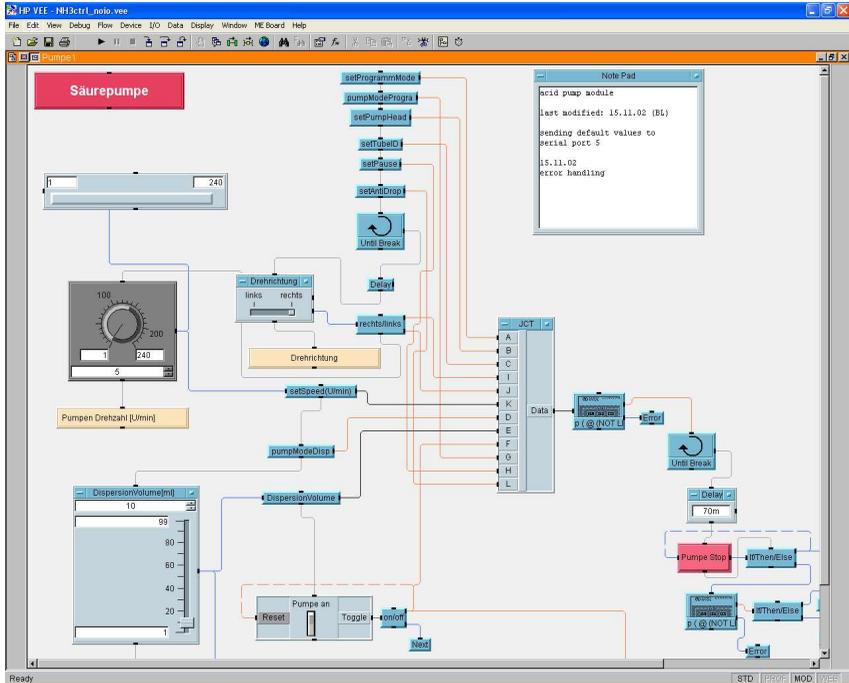


Abbildung 36 NH3Ctrl - Pumpensteuerungsmodul - Initialisierung

9.4.10 Pumpenmodul

Steuerschleife der Pumpe

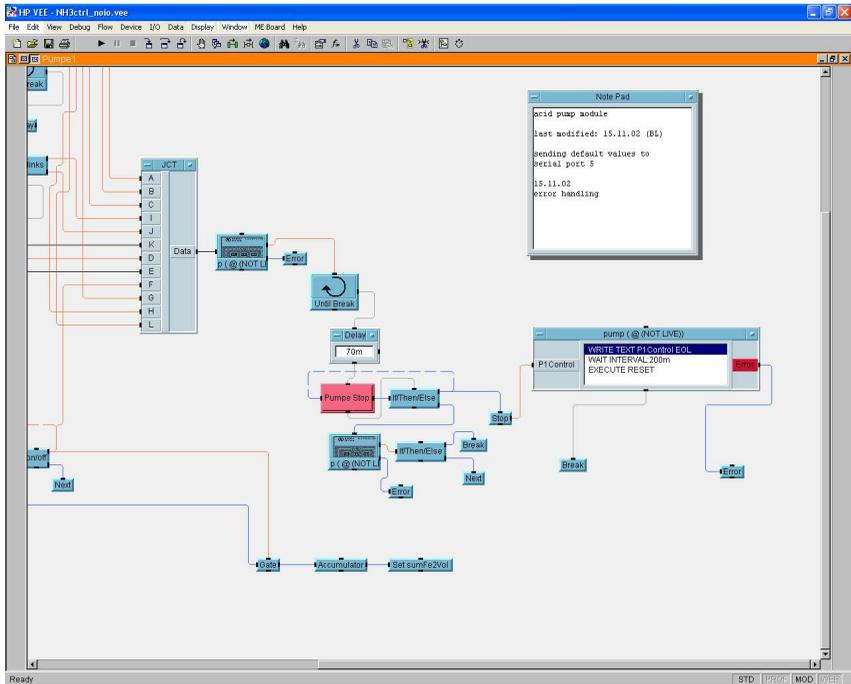


Abbildung 37 NH3Ctrl - Pumpensteuerungsmodul - Output

Wichtig ist hier das Abfangen eines Fehlers (Error, rot) beim Schreiben auf die RS-232-Schnittstelle – sonst droht Programmabsturz !

9.4.11 pH-Control

Die Konstanz des pH-Wertes ist für die Reaktion wichtig. Sie wird mit Hilfe dreier Komponenten erzielt:

- (1) einer speziellen, elektrolytfreien pH-Elektrode (*Fa. Mettler-Toledo*), die sulfid-unempfindlich ist und Temperaturen bis 80°C toleriert,
- (2) einem pH-Meter (*Fa. Schott*) mit analogem Spannungsausgang und
- (3) der *Meilhaus A/D-D/A-Steuerkarte (ME-3000)*

Hiermit konnte das gesamte pH-Steuerungsmodul realisiert werden. Da das pH-Meter nur einen analogen Schreiberausgang besaß, mußten die Spannungsänderungen des pH-Meters als analoges Signal erfasst und in digitale Steuersignale umgesetzt werden. Diese Aufgabe übernahm die *Meilhaus A/D-D/A Karte*. Softwareseitig wird das erhaltene Spannungssignal in einen pH-Wert umgerechnet. Diese Aufgabe leistet das User Object „VoltToPh“ im Programm. Eine in *HP-Vee* implementierte PID-Regelung gibt dann die Volumina zuzusetzender Säure bzw. Base für die zwei Schlauchpumpen aus.

Der Programmierer kann das nebenstehende pH-Steuerfenster bedienen. Der Knopf „pH-Calibration“ öffnet das pH-Kalibrationsfenster (Abbildung 39). Der Schalter „pH-

Control“ schaltet die gesamte pH-Steuerung ein oder aus. Der pH-Meter zeigt, bei angeschlossenem und kalibriertem pH-Meter den aktuellen pH-Wert an.

An dem Drehregler „Soll pH-Wert“ kann bei eingeschaltetem „pH-Control“ ein pH-Wert für den Reaktor vom Anwender vorgegeben werden, der dann durch das Regelmodul eingeregelt wird. Zur genaueren Regelung sollten die Konzentrationen der

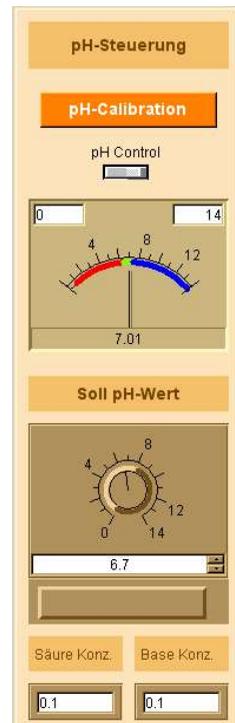


Abbildung 38 NH3Ctrl - pH-Steuerung - Benutzerfenster

Säure und Base in den Vorratsbehältern der Schlauchpumpen richtig in die untersten Felder eingetragen werden.

9.4.12 pH-Kalibrationsmodul

Abbildung 39 zeigt das Kalibrationsfenster, wie es der Anwender bedient. Das Volt-Meter zeigt die pH-Meter Spannung (hier wird das analoge Spannungssignal des pH-Meters am A/D-Wandler abgefragt). Durch betätigen der Knöpfe „pH4“ und „pH10“ werden die programminterne Variablen „U_pH4“ und „U_pH10“ gesetzt. Aus den den beiden Spannungen und den beiden pH-Werten kann eine Geradengleichung erzeugt und diese zur Berechnung des aktuellen pH-Wertes verwendet werden (s. Abbildung 40)

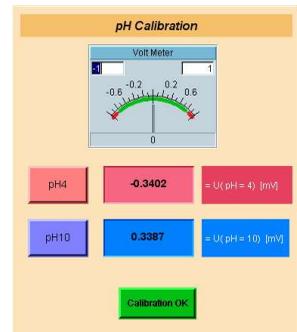


Abbildung 39 NH3Ctrl – pH-Kalibration - Benutzerfenster

9.4.13 pH-Kalibrations-Programm

Initialisierung der angeschlossenen Geräte für pH-Steuerung und Kalibration der pH-Wert Berechnung.

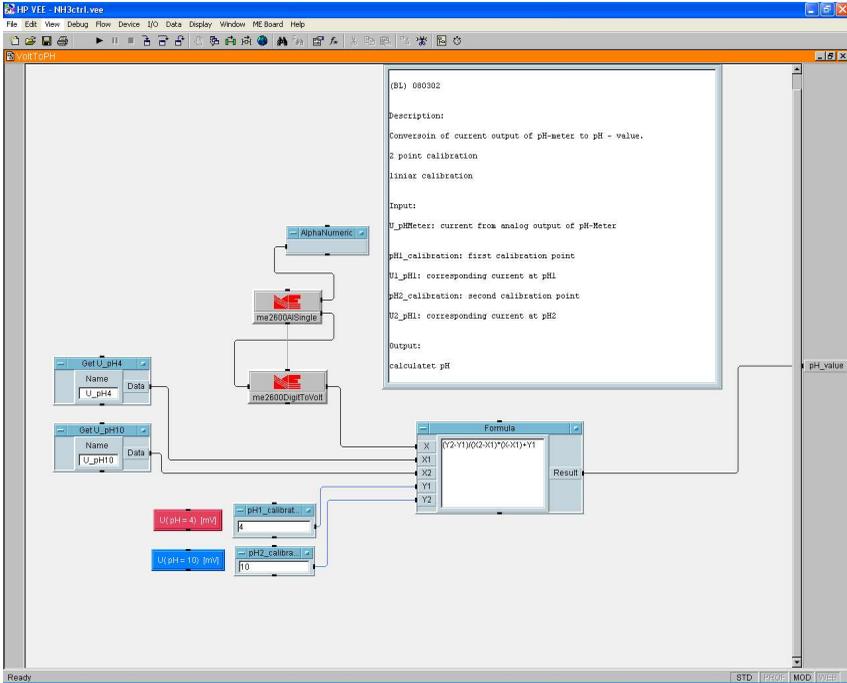


Abbildung 40 Berechnung des pH-Wertes aus der aktuellen pH-Meterspannung und einer durch Kalibration erzeugten Zweipunktgeraden

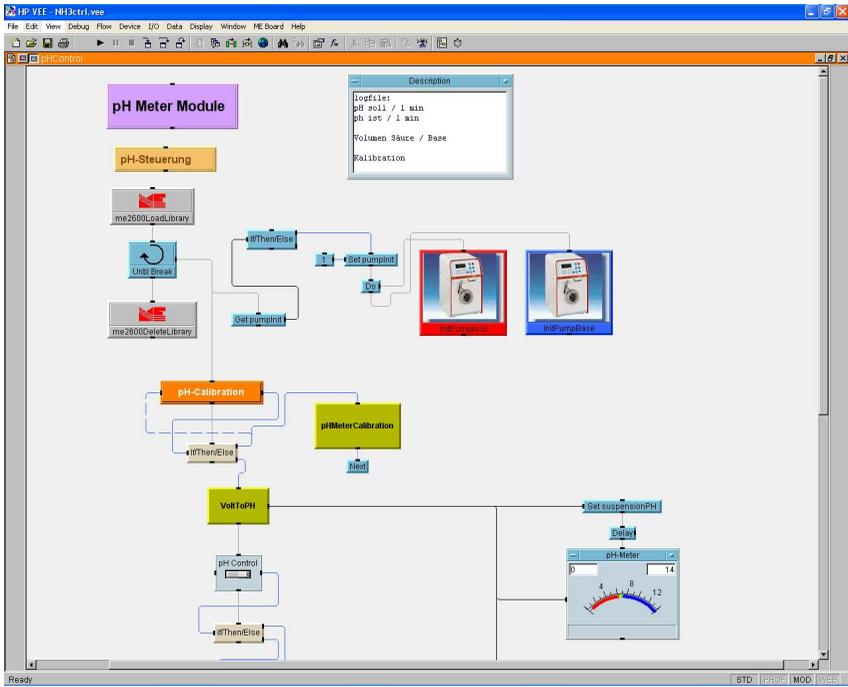


Abbildung 41 NH3Ctrl - pH-Steuerung - Initialisierung

9.4.14 pH-Steuerung

Hauptprogrammschleife mit Anweisungen der Pumpen, ein bestimmtes Säure- bzw. Basenvolumen zu pumpen.

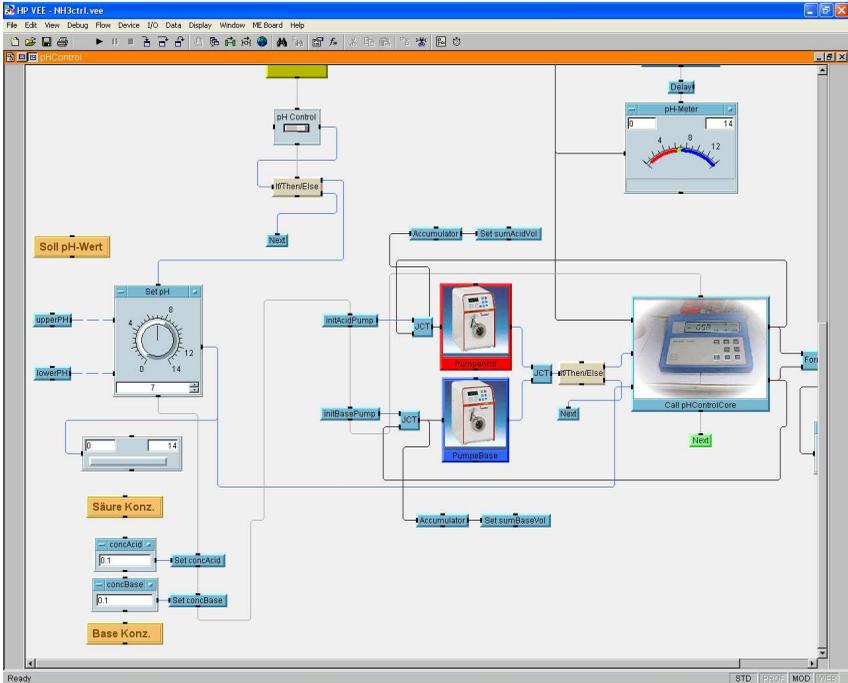


Abbildung 42 NH3Ctrl – pH-Steuerung - Hauptprogrammschleife

9.4.15 pH-Control

Entscheidungskern – hier wird die Menge an zuzusetzender Säure bzw. Base berechnet.

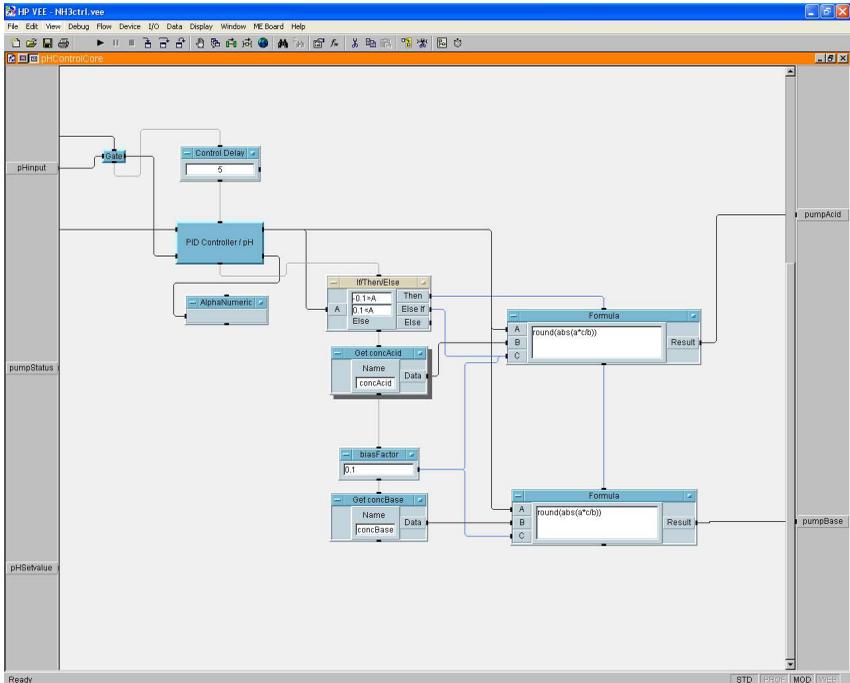


Abbildung 43 NH3Ctrl - pH-Steuerung - Entscheidungskern

9.4.16 pH-Kontrolle (Kern mit PID-Regelung)

Mit den Reglern Kp (proportional) KI (integral) und Kd (differential) können die Parameter der PID-Regelung an den konkreten Regelungsprozeß angepaßt werden.

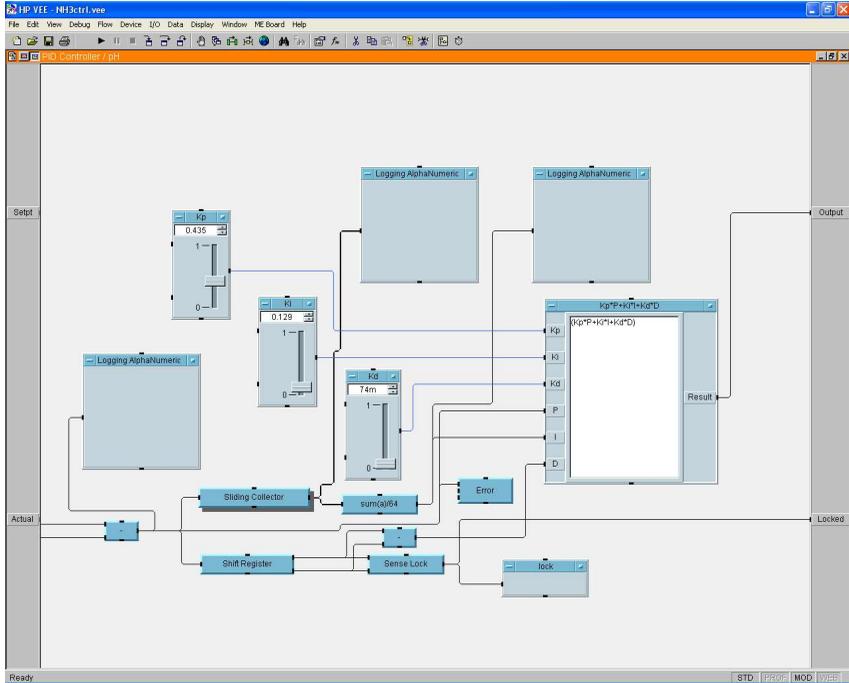


Abbildung 44 NH3Ctrl - pH-Steuerung - PID-Regelung

9.4.17 Dokumentationsmodul

Das vierte Modul erfasst viele anfallende Prozessdaten (pH-Wert, Gasfluss, Temperatur, Dauer, u.a.) und stellt diese in tabellarischer Form dar. Dies ermöglicht, den genauen Verlauf der Reaktion zu verfolgen und die Reaktion zu dokumentieren.

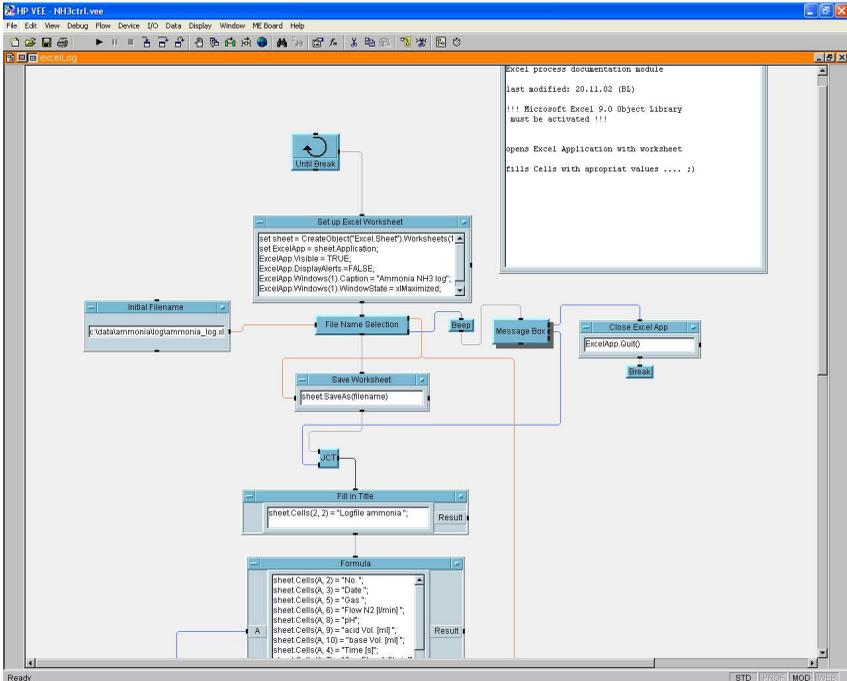


Abbildung 45 NH3Ctrl – Dokumentationsmodul - Kopf

9.4.18 Variabler Teil der Tabellendokumentation

Hier werden die einzelnen Zeilen unter Abfrage der aktuellen Variablenwerte – alle 180 s – in die Excel-Tabelle geschrieben. Die Tabelle wird nach jedem Eintrag unter dem Namen „filename“ gesichert.

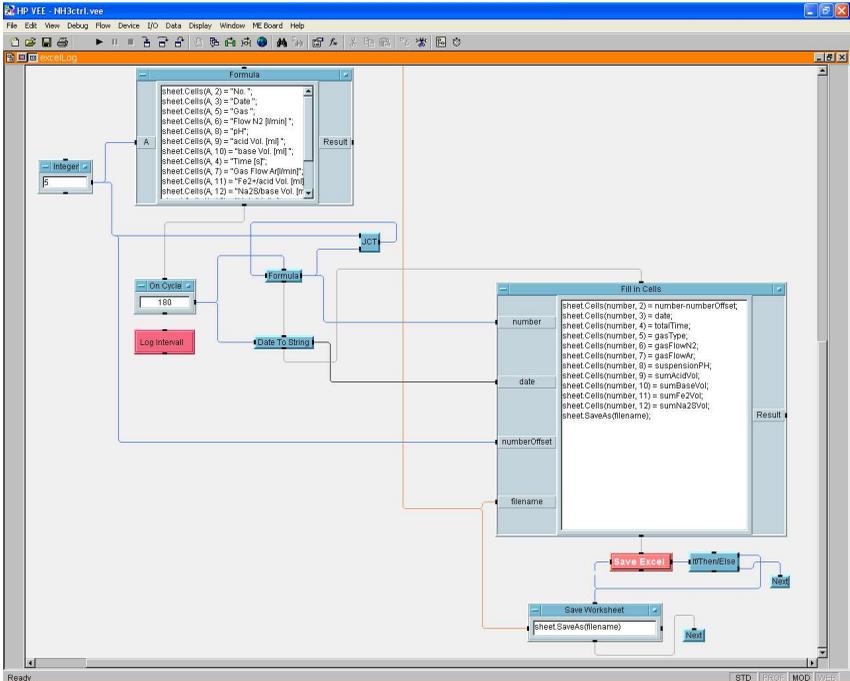


Abbildung 46 NH3Ctrl - Dokumentationsmodul - Tabellenfüllung und Speicherung

Selbständigkeitserklärung

Ich erkläre,

dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen angefertigt habe.

Jena, 12.12.2003, Mark Dörr

Lebenslauf

Am 15.01.1969 wurde ich als erster Sohn des Landwirts Günter Dörr und der ländlichen Hauswirtschaftsmeisterin Brigitte Dörr, geb. Cramer, in Wiesbaden geboren; lebe mit Andrea Krüger zusammen, wir haben eine Tochter, Hannah, geboren am 14.08.2002.

- 1975-1979 Grundschule in Wiesbaden-Breckenheim,
- 1979-1988 Oranienschule in Wiesbaden (naturwissenschaftliches
 Gymnasium), Abschluß mit Abitur
- 1988-1989 Bundeswehr
- 1989-1990 Zivildienst im mobilen, sozialen Hilfsdienst
- 1990-1994 Chemie-Studium an der Johannes-Gutenberg-Universität
 Mainz, Besuch von Vorlesungen in Molekularbiologie, Genetik,
 Germanistik und Filmwissenschaften, Abschluß mit Vordiplom
 Chemie
- 1994-1995 Biologie-Zweitstudium an der Johannes-Gutenberg-Universität
 Mainz, Abschluß mit Vordiplom
- 1995-1998 Fortsetzung des Chemie-Studiums an der Friedrich-Schiller-
 Universität Jena mit Besuch von Vorlesungen in Philosophie
 und Germanistik. Abschluß als Diplomchemiker. Der Titel der
 Diplomarbeit lautet: "Darstellung und Charakterisierung Fluor-
 markierter Peptide als biologische Modellsustanzen für die
 NMR-Spektroskopie"
- 1999-2004 Dissertation bei Professor Dr. Wolfgang Weigand (Chemisch-
 Geowissenschaftliche Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität
 Jena) mit dem Titel "Aktivierung von Stickstoff an
 Eisensulfidoberflächen – ein präbiotisches Nitrogenase-
 Modell?"

...

Far below, in the waters, some of the birds and animals looked up. "Someone is falling toward us from the sky," said one of the birds. "We must do something to help her," said another. Then two Swans flew up. They caught the Woman From The Sky between their wide wings. Slowly, they began to bring her down toward the water, where the birds and animals were watching. "She is not like us," said one of the animals. "Look, she doesn't have webbed feet. I don't think she can live in the water." "What shall we do, then?" said another of the water animals. "I know," said one of the water birds. "I have heard that there is Earth far below the waters. If we dive down and bring up Earth, then she will have a place to stand."

So the birds and animals decided that someone would have to bring up Earth. One by one tried. The Duck dove down first, some say. He swam down, far beneath the surface, but could not reach the bottom and floated back up. Then the Beaver tried. He went even deeper, so deep that it was all dark, but he could not reach the bottom, either. Then the Loon tried, swimming with his strong wings. He was gone a long, long time, but he, too, failed to bring up Earth. Soon it seemed that all had tried and all had failed. Then a small voice spoke "I will bring up Earth or die trying." They looked to see who it was. It was the tiny Muskrat. She dove down and swam and swam. She was not as strong or as swift as the others, but she was determined. She went so deep that it was all dark, and still she swam deeper. She went so deep that her lungs felt

ready to burst, but she swam deeper still. At last, just as she was becoming unconscious, she reached out one small paw and grasped at the bottom, barely touching it before she floated up, almost dead.

When the other animals saw her break the surface they thought she had failed. Then they saw her right paw was held tightly shut. "She has the Earth," they said. "Now where can we put it?" "Place it on my back," said a deep voice. It was the Great Turtle Hah-nu-nah, who had come up from the depths. They brought the Muskrat over to the Great Turtle Hah-nu-nah and placed her paw against his back. To this day there are marks at the back of the Turtle's shell which were made by Muskrat's paw. The tiny bit of Earth fell on the back of the Turtle. Almost immediately, it began to grow larger and larger until it became the whole world.

Then the two Swans brought the Sky Woman down. She stepped onto the new Earth and opened her hand, letting the seeds fall onto the bare soil. From those seeds the trees and the grass sprang up.

Life on Earth had begun.