

Einfluss der Temperatur auf methanogene Abbauprozesse in Reisfeldboden

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

dem

Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Axel Fey
aus Lich

Marburg/Lahn 2001

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden von Februar 1998 bis Januar 2001 am Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie, Abteilung Biogeochemie, in Marburg/Lahn unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Ralf Conrad durchgeführt.

Als Dissertation vom Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg
angenommen am:

Erstgutachter: Prof. Dr. Ralf Conrad
Zweitgutachter: Prof. Dr. Rudolf K. Thauer

Tag der Disputation:

Ein Großteil der in dieser Dissertation beschriebenen Ergebnisse sind in folgenden Originalpublikationen veröffentlicht bzw. zur Veröffentlichung eingereicht:

Fey, A. und Conrad, R. (2000): Effect of temperature on carbon and electron flow and on the archaeal community in methanogenic rice field soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 4790–4797.

Fey, A., Chin, K.-J. und Conrad, R. (submitted): Thermophilic methanogens in rice field soil. *Environmental Microbiology*.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	1
Zusammenfassung	2
I. Einleitung	4
1 Methanemissionen und Klima	4
2 Methanogene Abbauprozesse in Reisfeldboden	5
3 Methanogene <i>Archaea</i> im Reisfeldboden	8
4 Temperatureinfluss auf methanogene Abbauprozesse	9
5 Thermophile Methanogene	10
6 Fragestellung	12
II. Material und Methoden	14
1 Material	14
1.1 Verwendeter Boden	14
1.2 Verwendete Chemikalien und Gase	14
2 Chemische und physikalische Analysen	15
2.1 Gaschromatographische Analysen	15
2.1.1 Messung von Methan und CO ₂	15
2.1.2 Messung von Wasserstoff	15
2.2 Analyse organischer Verbindungen im Porenwasser	16
2.2.1 Nachweis organischer Säuren und Alkohole	17
2.2.2 Nachweis von Zuckern	17
2.3 Messung radioaktiver Isotope	18
2.3.1 Szintillationsmessungen	18
2.3.2 Analyse von ¹⁴ C-Gasen	18
2.3.3 Analyse von radioaktiver Glucose und organischen Säuren	19
2.4 Messung des Isotopenverhältnisses	19
2.5 pH-Messung	21
3 Bestimmung der hydrolytischen Enzymaktivität	21
3.1 Potentielle hydrolytische Aktivität	21
3.2 Aktuelle hydrolytische Aktivität	23
4 Kulturmedium für die Most Probable Number-Bestimmung	24
4.1 Lösungen	24
4.2 Ansatz des Mediums	26
5 Molekulare Methoden	27
5.1 DNA-Extraktion aus Bodenaufschlämmungen	27
5.2 Gelelektrophorese	28
5.3 Amplifikation der 16S rRNA Gene mit <i>Archaea</i> -spezifischen Primern	29

Inhaltsverzeichnis

5.4	T-RFLP-Analyse	30
6	Inkubationsexperimente	31
6.1	Ansatz der Bodenaufschlammungen	31
6.2	Experimente am Thermoblock	32
6.3	Versuche unter Steady-State-Bedingungen	32
6.3.1	Versuche mit radioaktiv markierten Substraten	33
6.3.2	$\delta^{13}\text{C}$ -Isotopenverhältnis	34
6.3.3	Bestimmung der Hydrolyse-Aktivität	34
6.3.4	Bestimmung der potentiellen Methanogenese	34
6.4	Bestimmung der Zellzahl H_2/CO_2 -verwertender Methanogener (MPN)	35
6.5	Analyse der methanogenen mikrobiellen Gemeinschaft	36
7	Berechnungen	36
7.1	Ratenberechnungen	36
7.2	Berechnung der Aktivierungsenergie	37
7.3	Thermodynamikberechnungen	37
7.4	Berechnungen zu den Radioaktivversuchen	39
7.4.1	Anteil der H_2/CO_2 -abhängigen Methanbildung	39
7.4.2	Berechnung des respiratorischen Index (RI)	39
7.4.3	Berechnung der Umsatzraten ^{14}C -markierter Substrate	40
7.5	Berechnung der Isotopensignatur	40
7.6	Berechnung des gelösten CO_2	41
7.7	Bilanzierung der Substratversuche	41
7.8	Zellzahlschätzung hydrogenotropher Methanogener	41
III.	Ergebnisse	43
1	Einfluss der Temperatur auf die Methanbildung und die daran beteiligte mikrobielle Gemeinschaft im physiologischen Temperaturbereich	43
1.1	Ausbildung eines Steady-State	43
1.2	Physiologie und mikrobielle Gemeinschaft unter Steady-State-Bedingungen	45
1.3	$\delta^{13}\text{C}$ -Messung	46
1.4	Zellzahl der H_2/CO_2 -abhängigen Methanogenen	50
2	Neue thermophile Methanogene in Reisfeldboden	51
2.1	Methanproduktion und methanogene Substrate	51
2.2	Mikrobielle Gemeinschaft	52
3	Einfluss der Temperatur auf methanogene Abbauprozesse - Suche nach dem limitierenden Schritt	54
3.1	Potentielle Hydrolyserate	54
3.2	Aktuelle Hydrolyserate	56
3.3	Potentielle Methanbildung aus verschiedenen Substraten	57
3.3.1	Intermediate und Produkte nach Stimulation mit verschiedenen Substraten	58
3.3.2	Methan-Produktionsraten	76
3.4	Substratumsatzraten unter in situ-Bedingungen	79

IV. Diskussion	82
1 Einfluss der Temperatur auf die Methanbildung und die daran beteiligte mikrobielle Gemeinschaft im physiologischen Temperaturbereich	82
1.1 Einfluss der Temperatur auf die CH ₄ -Bildung	83
1.2 H ₂ -Steady-State-Konzentration	83
1.3 Acetat-Steady-State-Konzentration	84
1.4 Beitrag von H ₂ /CO ₂ und Acetat zur Methanproduktion	84
1.5 Membran-Fluidität	85
1.6 Die methanogene mikrobielle Gemeinschaft	85
1.7 Homoacetogenese	87
1.8 Isotopie	87
1.9 Theoretische und tatsächlich Zellzahlen	90
2 Thermophile Methanogene in Reisfeldboden	92
3 Einfluss der Temperatur auf methanogene Abbauprozesse - Suche nach dem limitierenden Schritt	95
3.1 Potentielle und aktuelle Hydrolyse	95
3.2 Umsatz direkter und indirekter methanogener Substrate	98
3.2.1 Umsatz von Glucose	98
3.2.2 Umsatz von Propionat	102
3.2.3 Umsatz von Acetat	104
3.2.4 Umsatz von H ₂	105
3.3 Welcher Schritt ist limitierend für den methanogenen Abbau?	107
3.3.1 Raten des methanogenen Abbaus	107
3.3.2 Vergleich des Temperatureinflusses	109
4 Ausblick	112
V. Literaturverzeichnis	113
Anhang A	131
Anhang B	140
Danksagung	165
Erklärung	166
Lebenslauf	167

Abkürzungen

Bq	Bequerel (Zerfälle s ⁻¹)
Ci	Curie (3,7 × 10 ¹⁰ Zerfälle s ⁻¹)
cps	counts per second
dpm	decays per minute
GC	Gaschromatograph
H ₂ O dest.	destilliertes Wasser
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatograph („High performance liquid chromatograph“)
MPN	most probable number
MUF	Methylumbelliferon
PCR	Polymerase Kettenreaktion („Polymerase Chain Reaction“)
ppmv	Mischungsverhältnis: „parts per million by volume“
rpm	Umdrehungen pro Minute („rounds per minute“)
TB	Trockener Boden
Tg	Teragramm (10 ¹² Gramm)
T-RFLP	Terminaler Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismus („Terminal-Restriction Fragment Length Polymorphism“)
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen pro Volumen („volume by volume“)
w/v	Gewicht pro Volumen („weight by volume“)

Zusammenfassung

Reisfelder tragen mit 15-20% zu den anthropogenen Methanemissionen bei. Über den Einfluss der Temperatur, einen der wichtigsten Faktoren für die Methanproduktion, auf ein im Gleichgewicht befindliches System ist bisher nur wenig bekannt. Um den grundlegenden Einfluss der Temperatur auf die an der Methanbildung beteiligten Prozesse, sowie die dafür verantwortliche mikrobielle Gemeinschaft besser zu verstehen, wurden Aufschlammungen aus Reisfeldboden als Modellsystem benutzt. Die Experimente wurden unter Steady-State-Bedingungen durchgeführt, da auch der Boden natürlicher Reisfelder nach dem Fluten sehr schnell anoxisch wird und nach der Reduktion alternativer Elektronenakzeptoren ein stabiles methanogenes System bildet.

Es zeigte sich, dass die Methanbildung in Bodenaufschlammungen mit steigender Inkubationstemperatur im Temperaturbereich 10 bis 37°C zunahm. Der H₂-Partialdruck stieg unter Steady-State-Bedingungen mit der Temperatur von ca. 0,5 Pa bei 10°C auf ca. 3,5 Pa bei 37°C an. Daraus resultierte ein konstanter ΔG -Wert von -20 bis -25 kJ mol⁻¹ CH₄ für H₂/CO₂-abhängige Methanbildung, was als minimale benötigte Energie für mikrobielles Wachstum angesehen wird. Der Anteil H₂/CO₂-abhängiger Methanogenese an der CH₄-Produktion nahm mit der Temperatur von den erwarteten 33% bei 37°C auf nur 10-15% bei 10°C ab. Die Acetat-Konzentration im Porenwasser stieg im Steady-State mit abnehmender Temperatur von <5 µM auf 50 µM an. Eine Rolle spielen wahrscheinlich (1) eine veränderte Membranfluidität mit daraus resultierenden höheren Schwellenwerten für die Acetat-Aufnahme, (2) eine Beteiligung Homoacetogener an der Fermentation von Sacchariden oder (3) eine veränderte Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaft der *Archaea*. Letzteres wurde über den Terminalen-Restriktions-Fragmentlängen-Polymorphismus (T-RFLP) der 16S rRNA-Gene untersucht. Der *Euryarchaeot* Rice Cluster I und *Methanosaetaceae* waren die häufigsten methanogenen Gruppen. Die Zusammensetzung änderte sich mit der Temperatur. Der relative Anteil von *Methanosarcinaceae*, die einen relativ hohen Schwellenwert für Acetat haben, nahmen bei niedriger Temperatur zu.

Eine Erhöhung der Inkubationstemperatur auf bis zu 80°C ergab ein Temperaturoptimum bei 41°C, ein zweites T_{opt} wurde nach verlängerter Inkubation bei 50-55°C beobachtet. Ab 60°C fand keine CH₄-Bildung mehr statt. Aus der Akkumulation von H₂, CO₂, Acetat und Propionat zeigte sich, dass fermentative Prozesse bis 75-80°C aktiv waren. Offensichtlich

existieren thermophile Methanogene und Fermentierer in Reisfeldboden. Markierung mit ^{14}C -Bicarbonat ergab, dass die Methanbildung über H_2/CO_2 erfolgte, obwohl dies thermodynamisch relativ ungünstig war. Aus der T-RFLP-Analyse der 16S rRNA-Gene wurde deutlich, dass die Diversität der *Archaea* mit dem Überschreiten des ersten T_{opt} abnahm und Rice Cluster I bei 45 und 49°C mit einem relativen Anteil von 80% dominant wurde. Die Methanbildung erfolgte demnach bei $>45^\circ\text{C}$ wahrscheinlich über thermophile Mitglieder von Rice Cluster I aus H_2/CO_2 als Substrat.

Die Rate der potentiellen und der aktuellen Hydrolyse war bei allen Temperaturen höher als die Rate der CH_4 -Bildung und war ebenso wie die Glucose-Aufnahme nur wenig temperaturempfindlich. Bei Temperaturen $\geq 20^\circ\text{C}$ war die CH_4 -Bildung tendenziell substratlimitiert, da zusätzlich zugeführtes Substrat zu einer Stimulation der Methanogenese führte. Bei Temperaturen $\leq 20^\circ\text{C}$ war die CH_4 -Bildung eher temperaturlimitiert, da auch eine Zufuhr externer Substrate (Glucose, Propionat, Acetat, H_2) nur sehr begrenzt zu einer Erhöhung der Methanbildung führte. Bei 10°C ließ sich die Methanbildung nicht stimulieren, offensichtlich lag eine reine Temperaturlimitierung der Methanogenen vor. Für die Substratlimitierung bei $\geq 20^\circ\text{C}$ war weder die Hydrolyse von Zellulose noch die Glucose-Fermentation verantwortlich. Vielmehr schien die Hydrolyse selbst aufgrund geringer Verfügbarkeit hydrolysierbarer organischer Substrate limitiert zu sein.

I. Einleitung

1 Methanemissionen und Klima

Methan kommt als Spurengas in der Erdatmosphäre mit einer Konzentration von ca. 1,72 ppmv vor. Dies entspricht mehr als einer Verdopplung der Konzentration gegenüber der vorindustriellen Zeit (0,6 ppmv; IPCC, 1996). Mit einem Anteil von ca. 25% an der erwarteten Klimaerwärmung wird Methan neben CO₂ als einer der wichtigsten Verursacher des anthropogenen Treibhauseffekts angesehen (IPCC, 1996). Dieser hohe Anteil trotz der vergleichsweise geringen Konzentration kommt durch seine gegenüber CO₂ um Faktor 21 (pro mol) höhere Absorption von Licht im infraroten Bereich zustande (Bouwman, 1990; IPCC, 1995). Weiter kommt Methan wegen seiner relativ hohen Verweildauer von geschätzten 12±3 Jahren in der Erdatmosphäre und seinem jährlichen Anstieg von ca. 0,6% eine größere Rolle für unser Klima zu (Ehhalt, 1988; IPCC, 1996). Neben dem direkten Effekt kann in der Troposphäre in chemischen Reaktionen mit Methan Ozon produziert werden. In der Stratosphäre wird durch Reaktion von Methan mit dem Hydroxyl-Radikal (OH) Wasserdampf gebildet. Beide, Ozon und Wasserdampf, sowie das Endprodukt der Oxidation von Methan, CO₂, tragen zum Treibhauseffekt bei (IPCC, 1990). Insgesamt hat Methan, bezogen auf einen Zeitraum von 100 Jahren, ein gegenüber CO₂ um Faktor 21 höheres Treibhauspotential (IPCC, 1996). Trotz der in den 80er Jahren verringerten Zuwachsraten (Steele *et al.*, 1992) bleibt Methan ein klimarelevantes Treibhausgas. Dies macht es wichtig, die Quellen der Emissionen auszumachen und die dafür verantwortlichen Prozesse genauer zu identifizieren, um damit die Emissionen weiter senken zu können.

Die jährlichen Gesamtemissionen von Methan werden auf ca. 535 (410-660) Tg geschätzt (IPCC, 1996). Der größte Teil dieser Emissionen stammt aus biogenen Quellen, wie Wiederkäuermägen, Reisfeldern und Feuchtgebieten (Seiler, 1985; Aselmann und Crutzen, 1994). Es wird unterschieden zwischen natürlichen (Feuchtgebiete, Termiten, Ozeane, etc.) und anthropogenen Quellen (Wiederkäuermägen, Erdgas, Reisfelder, Abwässer, Mülldeponien sowie Verbrennung von Biomasse), wobei die anthropogenen Quellen mit einem Anteil von 60-80% klar dominieren (IPCC, 1996).

Reisfelder haben mit Emissionen von ca. 60 (20-100) Tg jährlich einen Anteil von bis zu 25% an den anthropogenen Methan-Quellen (IPCC, 1995; Cole *et al.*, 1996). Zur Zeit wird

Reis weltweit auf einer Fläche von ca. 145 Mio. ha angebaut und stellt für etwa die Hälfte der Weltbevölkerung das wichtigste Grundnahrungsmittel dar (FAO, 1985; Neue *et al.*, 1990; IRRI, 1991; Minami und Neue, 1994). Die steigende Weltbevölkerung wird in einem steigenden Bedarf an Nahrungspflanzen resultieren. Schätzungen gehen davon aus, dass die globale Reisproduktion innerhalb von 30 Jahren um ca. 43% gesteigert werden muss, um diesen Bedarf zu decken (Cassmann, 1999). Dies wird eine Intensivierung des Anbaus und eine Ausdehnung der Anbauflächen und damit einen Anstieg der Methanemissionen aus Reisfeldern zur Folge haben.

2 Methanogene Abbauprozesse in Reisfeldboden

Italienische Reisfelder werden im Frühjahr nach dem Pflügen geflutet und bleiben bis zum Ende der Vegetationsperiode überstaut. Durch die geringe Diffusion über die Grenzfläche Wasser/Boden gelangt nur sehr wenig Sauerstoff in den Boden. Auch der durch das Aerenchym der Reispflanzen in den Boden transportierte Sauerstoff ist schon in ca. 1 mm Entfernung zur Wurzel nicht mehr nachweisbar. Der nicht durchwurzelte Boden bildet demnach schon nach sehr kurzer Überstauung ein anoxisches Milieu, in dem nur noch anaerobe mikrobielle Prozesse mit Methan als Endprodukt ablaufen (Conrad, 1993). Im Gegensatz zu aeroben Bedingungen kann unter anaeroben Bedingungen kein Organismus allein organische Substanz abbauen. Eine komplexe Mikroorganismengemeinschaft mit bis zu fünf physiologischen Gruppen ist am methanogenen Abbau beteiligt. Anaerobe Abbauprozesse müssen mit einem sehr geringen Energiegewinn auskommen. Um dies thermodynamisch überhaupt zu ermöglichen, müssen Zwischenprodukte des Abbaus direkt von anderen Organismen weiterverwertet werden (Conrad, 1996; Westermann, 1996; Brock, 1997).

Der anaerobe Abbau von organischer Substanz ist im Prinzip bekannt (Zehnder, 1978; Schink, 1992; Conrad, 1993; Zinder, 1993; Stams, 1994). Abb. 1 zeigt eine schematische Darstellung der aufeinanderfolgenden Schritte des methanogenen Abbaus. Initialschritt ist die Hydrolyse von Polymeren wie Zellulose durch extrazelluläre Enzyme, die von fermentierenden Organismen produziert werden. Dabei entstehende Monosaccharide werden in einer primären Fermentation zu organischen Säuren, wie Acetat, Propionat, Butyrat, Succinat, zu Alkoholen sowie zu H₂ und CO₂ abgebaut. In einer sekundären Fermentation oxidieren gärende oder syntrophe Organismen Alkohole und organische

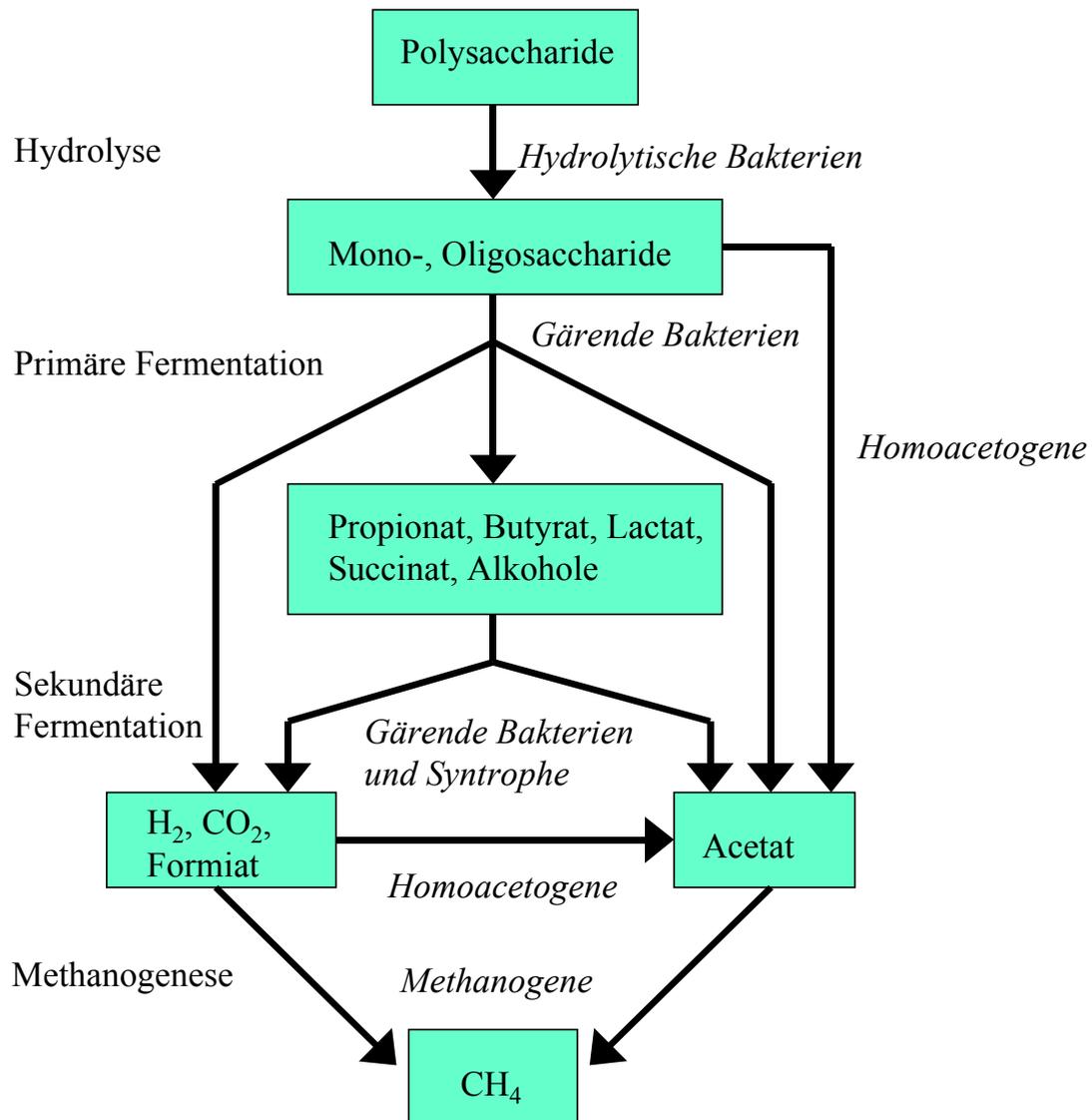


Abb. 1: Schema des anaeroben Abbaus von organischem Material zu Methan.

Säuren zu Acetat, H₂ und CO₂. Acetat kann außerdem von Homoacetogenen aus H₂/CO₂, Glucose und anderen Monosacchariden sowie einigen anderen Substraten gebildet werden. Am Ende des Abbaus stehen methanogene *Archaea*, die vorwiegend aus H₂/CO₂ oder Acetat Methan bilden.

Zellulose kann als wichtigstes Polysaccharid in terrestrischen Ökosystemen angesehen werden. Reisstroh besteht zu 37-49 % aus Zellulose (Watanabe *et al.*, 1993; Vlasenko *et al.* 1997). Weitere Bestandteile sind sogenannte Hemizellulosen wie Xylan (bis zu 30%) sowie Lignin. Zellulose besteht aus Ketten β-1,4-glycosidisch verbundener Glucose. Diese sind untereinander über Wasserstoffbrücken miteinander verbunden. Da diese

Makromoleküle nicht in die Zelle transportiert werden können, sind die am Abbau beteiligten Mikroorganismen auf eine Aufspaltung in Oligo- und Monomere angewiesen. Die Spaltung von Zellulose erfolgt hydrolytisch durch extrazelluläre Zellulasen. Diese stellen ein komplexes Enzymsystem dar, an dem mindestens drei Enzyme beteiligt sind. Endo- β -1,4-Glucanasen spalten die Zellulosemoleküle in kleinere Stränge. Exo- β -1,4-Glucanasen spalten von diesen Ketten Cellobiose ab, die wiederum von β -1,4-Glucosidasen in zwei Moleküle Glucose gespalten wird. Glucose und andere Monomere können zum weiteren Abbau in die Zelle aufgenommen werden (Colberg, 1988; Schlegel, 1992).

Glucose, das wichtigste Monosaccharid in Reisfeldboden (Chidthaisong *et al.*, 1999b), kann auf verschiedenen Wegen und unter Beteiligung mehrerer physiologischer Gruppen abgebaut werden. Im Reisfeldboden wird Glucose über den Embden-Meyerhof-Weg (Glycolyse) zu 2 Acetat, 2 CO₂ und 4 H₂ umgesetzt (Krumböck und Conrad, 1991). Neben Acetat, CO₂ und H₂ werden bei der Fermentation von Glucose in Reisfeldboden in geringerem Umfang auch andere Intermediate gebildet. Ein Teil des Abbaus läuft über Alkohole (z. B. Ethanol) bzw. organische Säuren (z. B. Lactat und Propionat), die dann syntroph zu Acetat, H₂ und CO₂ weiterverwertet werden (Conrad, 1996).

Methan wird unter strikt anaeroben Bedingungen aus H₂/CO₂, Formiat, Acetat, Methanol und methylierten Verbindungen wie Trimethylamin (TMA) und Dimethylsulfid (DMS) gebildet (Zinder, 1993). In Reisfeldboden spielen nach bisherigen Erkenntnissen nur die hydrogenotrophe (aus H₂/CO₂) und die acetoklastische (aus Acetat) Methanogenese eine größere Rolle (Conrad, 1999). Unter Annahme eines stöchiometrischen Abbaus von Glucose stammt das gebildete Methan zu 2/3 aus Acetat und zu 1/3 aus H₂/CO₂. Bei homoacetogener Beteiligung am Abbau hingegen kann entweder aus 1 CO₂ und 4 H₂ Acetat gebildet werden, oder Glucose wird direkt zu 3 Acetat umgesetzt. Unter diesen Bedingungen würde das Methan vollständig aus Acetat gebildet werden. In den meisten Studien wurde ein Anteil von Acetat >67% an der Methanogenese gefunden, was als Hinweis auf homoacetogene Beteiligung an der Fermentation von Sacchariden gewertet wurde (Rothfuss und Conrad, 1993a; Conrad und Klose, 1999a; Yao und Conrad, 2000b). In Reisfeldboden scheint demnach eine Mischung aus fermentativem und homoacetogenem Abbau vorzuliegen.

Die Bildung von Methan setzt erst ein, nachdem alle alternativen Elektronenakzeptoren (Nitrat, Sulfat, Fe (III), Mn (IV)) reduziert sind und damit das Redoxpotential weit genug

abgesenkt ist (Conrad, 1993; Achtnich *et al.*, 1995; Chidthaisong *et al.*, 1999b; Yao *et al.*, 1999b). Wasserstoff wird über einen „interspecies hydrogen transfer“ zwischen syntrophen H₂-Produzieren und H₂-verbrauchenden Methanogenen zur Methanproduktion genutzt. Dabei stellt sich ein thermodynamisch bedingter „Threshold“ (Schwellenwert) für H₂ in der Reihenfolge Homoacetogenese > Methanogenese > Sulfatreduktion > Nitratreduktion ein (Conrad, 1996). Deshalb findet normalerweise beim Einstellen anaerober Bedingungen eine sequentielle Reduktion von Nitrat, Eisen, Mangan, Sulfat und erst dann CO₂ statt. Yao und Conrad (1999a) konnten trotzdem in anaerob inkubierten Reisbodenaufschlammungen eine sofort einsetzende Methanproduktion beobachten, die nach einigen Tagen stoppte und erst nach der Reduktion der alternativen Elektronenakzeptoren wieder begann.

3 Methanogene *Archaea* im Reisfeldboden

Es wurde mehrfach versucht, Einblick in die methanogene Gemeinschaft der *Archaea* in Reisfeldboden zu bekommen (Kudo *et al.*, 1997; Reichardt *et al.*, 1997; Joulain *et al.*, 1998). In Kultivierungsstudien wurden aus Reisfeldboden meist *Methanosarcina* spp. und *Methanobacterium* spp. isoliert (Rajagopal *et al.*, 1988; Conrad *et al.*, 1989; Asakawa *et al.*, 1995; Joulain *et al.*, 1998).

Aus den 16S rRNA-Genen generierte Klonbibliotheken ergaben eine wesentlich größere Diversität der methanogenen *Archaea* in Reisfeldboden als vorher aufgrund von klassischen Kultivierungen angenommen wurde und mehrere neue phylogenetische Linien wurden hierbei entdeckt (Großkopf *et al.*, 1998a,b; Chin *et al.*, 1999a; Lueders und Friedrich, 2000). Die wichtigsten in italienischem Reisfeldboden gefundenen Linien waren Methanogene der Familien *Methanobacteriaceae*, *Methanomicrobiaceae*, *Methanosaetaceae* und *Methanosarcinaceae*. Außerdem wurden die zu den *Euryarchaeota* gehörenden Rice Cluster I und II, III und V und die zu den *Crenarchaeota* gehörenden Rice Cluster IV und VI nachgewiesen (Großkopf *et al.*, 1998a,b; Chin *et al.*, 1999a; Lueders und Friedrich, 2000). Die bisher in mesophilen Habitaten detektierten *Crenarchaeota* wurden in vier verschiedene Cluster eingeordnet (Buckley *et al.* 1998). Die in italienischem Reisfeldboden gefundenen *Crenarchaeota* Rice Cluster IV und VI entsprechen dem „Freshwater Cluster“ bzw. dem „Terrestrial Cluster“ (Lueders und Friedrich, 2000). Rice Cluster I und II sind wahrscheinlich methanogen (Lehmann-Richter,

1999). Für Rice Cluster I konnte dies durch den Nachweis des Methyl-Coenzym M-Reduktase-Gens in einer Anreicherungskultur bestätigt werden (Lueders *et al.*, 2001).

In jüngster Zeit wurde die T-RFLP-Analyse (Terminaler-Restriktionsfragmentlängen-Poly-morphismus) als schnelle PCR-basierende Screening-Methode entwickelt (Liu *et al.*, 1997) und erfolgreich bei der Untersuchung von Reisfeldboden angewandt (Chin *et al.*, 1999a; Lueders und Friedrich, 2000; Ramakrishnan *et al.*, 2000). Diese Methode liefert nicht nur Informationen über die Diversität eines Ökosystems, sondern auch über die relative Abundanz der einzelnen Terminalen Restriktionsfragmente, was die Methode zu einem äußerst nützlichen Werkzeug für die Analyse mikrobieller Gemeinschaften macht (Liu *et al.*, 1997; Osborn *et al.*, 2000).

4 Temperatureinfluss auf methanogene Abbauprozesse

Methanemissionen aus Reisfeldboden wurden intensiv untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die Temperatur, der Salzgehalt, das Redoxpotential, der pH und die Verfügbarkeit von organischem Substrat die wichtigsten Faktoren für methanogene Abbauprozesse sind (Conrad, 1993; Neue und Roger, 1993). Unter diesen Faktoren wird die Temperatur als einer der wichtigsten angesehen (Conrad *et al.*, 1987; Schütz *et al.*, 1990; Khalil *et al.*, 1998). Es ist bekannt, dass die Methan-Produktion im Reisfeldboden mit steigender Temperatur exponentiell ansteigt (Schütz *et al.*, 1990; Westermann, 1994; Conrad, 1996). Die Temperatur hat allerdings nicht nur einen Einfluss auf die Methanogenese selber, sondern auch auf den Abbau von organischem Material, aus dem die methanogenen Substrate gebildet werden (Conrad *et al.*, 1987; Schütz *et al.*, 1990; Chin und Conrad 1995; Kimura *et al.*, 1993).

Sowohl in Reisfeldboden als auch in Sedimenten wurden Hinweise gefunden, dass der Anteil von H_2/CO_2 an der Methanbildung mit sinkender Temperatur abnimmt (Conrad *et al.*, 1987; Conrad *et al.*, 1989; Chin und Conrad, 1995; Schulz und Conrad, 1996; Schulz *et al.* 1997; Nüsslein und Conrad, 2000). Mehrere Autoren konnten die Existenz psychrotoleranter Homoacetogener nachweisen, die bei niedrigen Temperaturen mit den Methanogenen um H_2 konkurrieren (Conrad *et al.*, 1989; Kotsyurbenko *et al.*, 1993; Nozhevnikova *et al.*, 1994; Kotsyurbenko *et al.*, 1996). In Reisfeldboden werden bis zu 10% des Acetats aus CO_2 gebildet (Thebrath und Conrad, 1992; Rothfuss und Conrad,

1993b). Noch höhere Beteiligung Homoacetogener von bis zu 40% wurden nach Hemmung der acetoklastischen Methanogenese mit Methylfluorid gefunden (Conrad und Klose, 1999a). Homoacetogene Acetatbildung bei niedriger Temperatur würde zu einem erhöhten Anteil acetoklastischer Methanbildung führen. Allerdings konnte gezeigt werden, dass Homoacetogenese aus H_2/CO_2 unter *in situ*-Bedingungen thermodynamisch kaum möglich sein dürfte (Chin und Conrad, 1995; Roy *et al.*, 1997).

Aus bei 15 bzw. 30°C inkubiertem Reisfeldboden generierte Klonbibliotheken der 16S rRNA zeigten eine komplett unterschiedliche Zusammensetzung der Gemeinschaft der *Archaea* (Chin *et al.*, 1999a). Dies konnte auch in einer Zellulose-verwertenden Anreicherungskultur bestätigt werden (Chin *et al.* 1999b). Eine Quantifizierung der Zusammensetzung über eine große Temperaturspanne wurde bisher nicht durchgeführt.

Offensichtlich hat die Temperatur einen großen Einfluss sowohl auf die anaeroben Abbauprozesse mit Methan als Endprodukt als auch auf die Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaft. Die bisher durchgeführten Studien über den Temperatureffekt in Reisfeldboden waren meist beschränkt auf wenige Temperaturen, auf relativ kurze Inkubationszeiten, oder es wurden kurzfristige Temperaturshifts untersucht (Chin und Conrad, 1995; Yang und Chang, 1998; Yao und Conrad, 1999b). Solche Temperaturshifts können kurzfristige Effekte bewirken, die sich möglicherweise deutlich von den Effekten in einem im Steady-State befindlichen System unterscheiden können (Westermann, 1994). Über den Temperatureinfluss auf im Gleichgewicht (Steady State) befindliche mikrobielle Gemeinschaften und deren Aktivität liegen nur wenige Arbeiten vor. Steady-State-Bedingungen werden in Reisfeldboden einige Zeit nachdem Sulfat und Fe (III) reduziert wurden, erreicht. Dies geschieht um so schneller, je höher die Inkubationstemperatur ist (Van Bodegom und Stams, 1999; Yao und Conrad, 2000a) und ist charakterisiert durch niedrige H_2 - und Acetat-Konzentrationen und konstante CH_4 - und CO_2 -Produktionsraten (Yao *et al.*, 1999; Yao und Conrad, 2000b).

5 Thermophile Methanogene

Thermophile und hyperthermophile Methanogene werden meist aus heißen Habitaten, wie Geothermen, Ölfeldern, heißen Quellen in tiefen Seen oder ozeanischen Sedimenten und in mikrobiellen Matten von Solfataren gefunden (Rozanova *et al.*, 1988; Ng *et al.*, 1989;

Jørgensen *et al.*, 1992; Kristjansson und Stetter, 1992; Barns *et al.*, 1994; Elsgaard *et al.*, 1994a,b; Stetter, 1996; Jeanthon, 2000; Orphan *et al.*, 2000; Sievert *et al.*, 2000; Skirnisdottir *et al.*, 2000). Thermophiler granulärer Faulschlamm ist ein anderes intensiv studiertes Habitat (Van Lier *et al.*, 1996; Sekiguchi *et al.*, 1998). Im Gegensatz zu diesen Studien, wurde thermophilen Mikroorganismen in kalten oder gemäßigten Habitaten bisher wenig Beachtung geschenkt, obwohl thermophile sogar in permanent kalten Habitaten zu existieren scheinen. Zum Beispiel wurden thermophile Sulfatreduzierer aus kalten marinen Sedimenten isoliert (Isaksen *et al.*, 1994). Der thermophile H₂-oxidierende *Bacillus schlegelii* wurde in Eis-Proben und in kalten Seesedimenten gefunden (Bonjour *et al.*, 1988). Nozhevnikova *et al.* (1997) wiesen thermophile Methanproduktion in tiefen kalten Seen bei bis zu 70°C und mit einem Temperaturoptimum von 50°C nach.

Die Temperaturen in Reisfeldböden liegen im Bereich von 15 bis 30°C (Schütz *et al.*, 1990). Trotzdem scheinen in diesen Böden thermophile Methanogene zu existieren. Yang und Chang (1998) wiesen zwei Temperaturoptima für die Methanproduktion bei 37 und 60°C in Reisfeldböden aus Taiwan nach. Yao und Conrad (2000a) untersuchten vier verschiedene Reisfeldböden aus Italien und den Philippinen und fanden in allen Böden ein zweites Temperaturoptimum bei $\geq 50^\circ\text{C}$. In beiden Studien zeigte sich das zweite Temperaturoptimum erst nach längerer lag-Phase, was auf ein Aufwachsen einer thermophilen methanogenen Flora hinweist. Trotz dieser offensichtlich weiten Verbreitung thermophiler Methanogenese in Reisfeldböden sind die beteiligten Methanogenen und das von ihnen genutzte Substrat unbekannt.

6 Fragestellung

Obwohl methanogene Abbauprozesse schon intensiv untersucht wurden, bestehen in Bezug auf einen der wichtigsten Faktoren – die Temperatur – noch große Lücken. Reisfeldboden stellt ein geradezu ideales Habitat für methanogenen Abbau dar. Ein Großteil des Bodens im gefluteten Reisfeld ist nach kurzer Zeit anoxisch. Deshalb wurden in dieser Arbeit anaerobe Bodenaufschlammungen aus vorher luftgetrocknetem Reisfeldboden als Modellsystem benutzt.

Um die zugrundeliegenden Prozesse zu verstehen und die Auswirkung der Temperatur auf methanogene Abbauprozesse abschätzen zu können, erschien es sinnvoll die Versuche unter Steady-State-Bedingungen – einem Zeitpunkt, zu dem sämtliche alternativen Elektronenakzeptoren bereits reduziert sind und sich eine stabile mikrobielle methanogene Gemeinschaft etabliert hat – durchzuführen. Deshalb wurden sämtliche Experimente erst nach einer ausreichend langen Vorinkubation (bis zur gleichmäßigen Methan- und CO₂-Produktion) durchgeführt. Der für die meisten Versuche gewählte Temperaturbereich lag bei 10 bis 37°C, da dies den Bereich der Temperaturschwankungen in italienischen Reisfeldern (15 - 30°C) einschließt (Holzapfel-Pschorn und Seiler, 1986; Schütz *et al.*, 1990).

In Bezug auf den Einfluss der Temperatur auf methanogene Abbauprozesse in Reisfeldboden stellen sich folgende Fragen:

- 1) Welchen Einfluss hat die Temperatur auf die Methanogenese?
- 2) Ändert sich der Anteil von H₂/CO₂ bzw. Acetat an der Methanogenese?
- 3) Bei welcher Temperatur wird die maximale Methanproduktion erreicht (Temperaturoptimum) und bis zu welcher Temperatur findet Methanbildung statt (Temperaturmaximum)?
- 4) Gibt es einen temperaturabhängigen „Bottleneck“, also einen limitierenden Schritt im methanogenen Abbau (Hydrolyse, Fermentation, Methan-Produktion) und welcher ist das?
- 5) Ändert sich der Weg des fermentativen Abbaus mit der Temperatur?
- 6) Welchen Einfluss hat die Temperatur auf die Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaft?

Zur Beantwortung dieser Fragen sollte mit Hilfe eines Thermoblocks der Zusammenhang zwischen Temperatur und Methan-Produktionsrate untersucht sowie Temperaturoptimum (T_{opt}) und Temperaturmaximum (T_{max}) der Methanogenese bestimmt werden. Über Zugabe von ^{14}C -markiertem Bicarbonat bzw. über das $\delta^{13}C$ -Isotopenverhältnis sollte der Einfluss der Temperatur auf den Anteil von H_2/CO_2 an der Methanogenese untersucht werden. Zugabe von direkten und indirekten methanogenen Substraten sowie Markierung mit ^{14}C -Substraten sollten zeigen, ob die Methanogenese temperatur- oder substratlimitiert ist und ob es eine temperaturabhängige Änderung des Abbaufweges gibt. Die sich daraus ergebenden potentiellen (unter Substratsättigung) und aktuellen (unter *in situ*-Substratkonzentration) Methan-Produktionsraten sollten mit den potentiellen und aktuellen Raten des Initialschritts beim Abbau von Polymeren – der Hydrolyse – verglichen werden. Dies soll Aufschluss darüber geben, ob es einen „Bottleneck“ gibt, also eine temperaturlimitierte Abbaureaktion beispielsweise im psychrophilen Bereich.

Mit Hilfe von T-RFLP-Analyse (Terminaler Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismus) der 16S rRNA-Gene sollte untersucht werden, ob sich die Zusammensetzung der mikrobiellen methanogenen Gemeinschaft mit der Temperatur ändert.

II. Material und Methoden

1 Material

1.1 Verwendeter Boden

Der in allen Experimenten verwendete Boden wurde im März 1998 aus gepflügten, aber noch nicht gefluteten Reisfeldern des „Italian Rice Research Institute“ in Vercelli in der Po-Ebene, Italien, aus dem Pflughorizont entnommen. Der Boden wurde luftgetrocknet und bei Raumtemperatur gelagert. Bei dem Boden handelt es sich um einen sandig-lehmigen Schluff (Uls). Die Korngrößenzusammensetzung in % wurde am Institut für Bodenkunde und Bodenerhaltung, Justus-Liebig-Universität Gießen, durchgeführt (Na-Pyrophosphatvorbehandlung, kombinierte Sieb- und Pipettmethode; Schlichting *et al.*, 1995) und ist Tab. 1 zu entnehmen.

Tab. 1: Korngrößenzusammensetzung [%] des verwendeten Bodens.

Fraktion	grob	mittel	fein	Σ
Sand	4,2	10,3	12,4	26,9
Schluff	29,8	19,8	8,9	58,5
Ton				14,6
				100,0

1.2 Verwendete Chemikalien und Gase

Chemikalien wurden, wenn nicht anders angegeben, von Firma Merck (Darmstadt), Fluka (München) oder Sigma-Aldrich (Steinheim) bezogen. Der Reinheitsgrad entsprach „zur Analyse“. Die verwendeten ^{14}C -Substrate stammten von Amersham-Bucheler (Braunschweig). Die eingesetzten technischen Gase wurden über Messer-Griesheim AG (Frankfurt a.M.) bezogen. Für molekulare Untersuchungen wurden, wenn nicht anders angegeben, Biochemikalien von Promega (Mannheim) eingesetzt. Die für molekulare Methoden sowie Kulturmedien verwendeten Lösungen und Puffer wurden durch Autoklavieren (30 min bei 121°C) sterilisiert. Nicht autoklavierbare Bestandteile wurden sterilfiltriert (0,2 μm , Porengröße, Nr. FP 030/3, Schleicher und Schuell, Dassel) und unter sterilen Bedingungen zugesetzt.

2 Chemische und physikalische Analysen

2.1 Gaschromatographische Analysen

2.1.1 Messung von Methan und CO₂

Methan und CO₂ wurden mit einem Gaschromatographen GC-8A (Shimadzu, Kyoto, Japan) gemessen (Tab. 2). Es wurden 0,1 ml Headspace-Proben mit einer gasdichten Spritze (100 µl) mit Pressure Lok (1710 RNR, Hamilton, Reno, Nevada) durch das Septum entnommen und analysiert. Die Eichung wurde mit einem Gasgemisch aus jeweils 1000 ppmv CO, CO₂, CH₄ in N₂ (Messer-Griesheim, Darmstadt) durchgeführt.

Tab. 2: Betriebsdaten des Gaschromatographen GC-8A.

Säule	2 m Edelstahlsäule, Ø 1/8“, Porapack QS 50/100 mesh
Trägergas	Wasserstoff 5.0
Detektor	FID, Brenngase: H ₂ und FID-Gas Quenchgas: N ₂
Methanisator	Eigenbau, Säule: NiCr-Ni-Katalysator (Chrompack, Middelburg, Niederlande), 20 cm Edelstahlsäule, Ø 1/8“
Temperatur	Injektor, Säule: 40°C Detektor: 110°C Methanisator: 350°C
Integrator	C-R A6 (Shimadzu, Kyoto, Japan)
Nachweisgrenze	1 ppmv CH ₄

2.1.2 Messung von Wasserstoff

Zur Bestimmung von Wasserstoff <100 ppm wurde ein Gaschromatograph mit „Reducing Gas Detector“ (RGD2) eingesetzt (Tab. 3). Zur Messung wurden 0,1 ml Gasprobe mit einer gasdichten Spritze mit Pressure Lok (siehe 2.1.1) entnommen. Die Eichung wurde mit 50 ppmv H₂ in N₂ (Messer-Griesheim, Darmstadt) durchgeführt.

Tab. 3: Betriebsdaten des RGD2-Gaschromatographen.

Säule	1,4 m Edelstahlsäule, Ø 1/2“, Trägermaterial: Molekularsieb 5A, 80-100 mesh
Trägergas	Synthetische Luft
Detektor	HgO-Detektor
Temperatur	Säule: 65°C Detektor: 280°C
Integrator	C-R A6 (Shimadzu, Kyoto, Japan)
Nachweisgrenze	1 ppmv H ₂

Für Wasserstoffkonzentrationen >100 ppmv wurde ein Gaschromatograph GC-8A (Shimadzu, Kyoto, Japan) mit Wärmeleitfähigkeitsdetektor eingesetzt (Tab. 4). Zur Messung wurden 0,2 ml Gasprobe mit einer gasdichten Spritze mit Pressure Lok (250 µl, Series A-2, Dynatech, Precision Sampling Corporation, Louisiana, USA) entnommen. Die Eichung wurde mit 1000 ppmv H₂ in N₂ (Messer-Griesheim, Darmstadt) durchgeführt.

Tab. 4: Betriebsdaten des GC-WLD.

Säule	2 m Edelstahlsäule, Ø 1/8“, Trägermaterial: Molekularsieb 5A, 80-100 mesh
Trägergas	Stickstoff 4.5
Detektor	Wärmeleitfähigkeitsdetektor
Temperatur	Säule, Detektor: 80°C
Integrator	C-R A6 (Shimadzu, Kyoto, Japan)

2.2 Analyse organischer Verbindungen im Porenwasser

Organische Säuren, Zucker und Alkohole im Porenwasser wurden mittels HPLC bestimmt. Dazu wurden den Proben 2 ml Bodenaufschlammung entnommen (3 Parallelen). Diese wurden 15 min bei 13.000 rpm zentrifugiert (Biofuge 13, Kendro, Darmstadt). Der Überstand wurde bis zur Messung bei -25°C gelagert.

2.2.1 Nachweis organischer Säuren und Alkohole

Organische Säuren und Alkohole in Porenwasserproben wurden mittels HPLC (Sykam, Gilching) bestimmt (Tab. 5).

Tab. 5: Betriebsdaten der HPLC-Anlage

Säule	30 cm Edelstahlsäule, Ø 7,8 mm
Pumpe	SP1000
Säulenofen	S4110
Trägermaterial	ORH-801 Ion-exclusion form, H ⁺ (Interaction, Vertrieb Schambeck SFD GmbH, Bad Honnef)
Fließmittel	1 mM Schwefelsäure
Fluß	0,8 ml min ⁻¹
Ofentemperatur	60°C
Detektor	Brechungsindex- (RI-) Detektor 2000F (Schambeck, Bad Honnef), Betriebstemperatur 40°C UV-Detektor Linear UVIS 200, Wellenlänge: 205 nm
Autosampler	Jasco 851-AS (Jasco, Japan)
Nachweisgrenze	3 µM

Nach dem Auftauen wurden die Proben abzentrifugiert (15 min, 13.000 rpm), dann durch 0,2 µm Mikrofilter (Minisart SRP 15, Sartorius, Göttingen) in frische Reaktionsgefäße filtriert. Die Einspritzmenge betrug 100 µl. Eichungen wurden mit verschiedenen organischen Säuren und Alkoholen (0,1 mM bzw. 1 mM) durchgeführt. Die Auswertung der Messdaten erfolgte über das Computerprogramm Peak Simple (SRI Instruments).

2.2.2 Nachweis von Zuckern

Zucker im Porenwasser wurde mittels HPLC (Sykam, Gilching) bestimmt (Tab. 6). Die Probenvorbereitung erfolgte wie oben, allerdings wurden nur sterile Pipettenspitzen und Reaktionsgefäße verwendet, um einen Abbau der Zucker zu verhindern. Zur Messung wurden 100 µl Probe mit einer Mikroliter-Spritze (100 µl; Hamilton, Bonaduz, Schweiz) direkt eingespritzt. Eichungen wurden mit verschiedenen Zuckern (0,1 mM bzw. 1 mM) durchgeführt. Die Auswertung der Peaks im RI-Detektor erfolgte über das Computerprogramm Peak Simple (SRI Instruments).

Tab. 6: Betriebsdaten der HPLC-Anlage

Säule	30 cm Edelstahlsäule, Ø 7,8 mm CARBOsep CHO-682 Pb (Transgenomics™, bezogen von Schambeck SFD GmbH, Bad Honnef)
Pumpe	SP1000
Säulenofen	S4110
Fließmittel	1 mM deionisiertes Wasser
Fluß	0,4 ml min ⁻¹
Ofentemperatur	80°C
Detektor	Brechungsindex- (RI-) Detektor S3500 (Sykam, Gilching) UV-Detektor Linear UVIS 204, Wellenlänge: 205 nm
Autosampler	Jasco 851-AS (Jasco, Japan)

2.3 Messung radioaktiver Isotope

2.3.1 Szintillationsmessungen

Zur Bestimmung der Aktivität der zur Markierung eingesetzten ¹⁴C-Substrate wurden Verdünnungen der Gebrauchslösung im Szintillationsmeßgerät LS 6500 (Beckmann, München) untersucht. Dazu wurden 50 bis 200 µl des Standards zu 15 ml Quickzint 501 (Zinsser, Frankfurt) gegeben und 2 min im Szintillationszähler gemessen. Zur Bestimmung der Restaktivität wurden 100 µl Porenwasser wie oben beschrieben gemessen. Der Szintillationszähler führte eine automatische Quenchkorrektur durch.

2.3.2 Analyse von ¹⁴C-Gasen

Bei den Versuchen mit ¹⁴C-Markierung wurden die Messungen von Methan und CO₂ an einem Gaschromatographen GC-8A (Shimadzu, Kyoto, Japan), ausgestattet mit Methanisator und Radioaktivitäts-Gas-Detektor (RAGA) durchgeführt (Tab. 7).

Tab. 7: Betriebsdaten des Gaschromatographen zur ^{14}C -Messung

Säule	2 m Edelstahlsäule, \varnothing 1/8“, Porapack QS 50/100 mesh
Trägergas	Wasserstoff 5.0
Quenchgas	Methan
Detektor	FID, Brenngase: H_2 und Synthetische Luft RAGA Typ IM 2026/2028 (Raytest, Straubenhardt), 10 ml Durchflußzählrohr
Methanisator	Eigenbau, Säule: Nickelkatalysator (Chrompack)
Temperatur	Säule: 40°C Methanisator: 350°C
Nachweisgrenze	ca. 500 dpm/ml

Zur Messung wurde 1 ml Gasprobe mit einer gasdichten Spritze (1 ml, Dynatech, siehe 2.1.1) injiziert. Kalibriert wurde mit einem Gasgemisch aus jeweils 1000 ppmv CO , CO_2 , CH_4 in N_2 (Messer-Griesheim, Darmstadt) und mit einem ^{14}C -Bicarbonatstandard. Dazu wurden 100 μl ^{14}C -Bicarbonat-Stammlösung in eine ausgeliterte mit 10 ml H_2O befüllte 120 ml Serumflasche mit N_2 -Gasphase injiziert. Durch Zugabe von 1 ml H_2SO_4 (1M) wurde das gelöste Bicarbonat vollständig in gasförmiges CO_2 umgewandelt. Dieses wurde in der RAGA analysiert. Die Gegeneichung des ^{14}C -Bicarbonat-Standards erfolgte im Szintillationszähler. Die Auswertung der Messungen erfolgte über das Computerprogramm GINA der Firma Nuclear Interface.

2.3.3 Analyse von radioaktiver Glucose und organischen Säuren

Die Analyse von ^{14}C -markierter Glucose und organischen Säuren in Porenwasser erfolgte mit der in Kapitel 2.2.1 beschriebenen HPLC-Anlage, mit einem Flüssigkeits-Szintillator RAMONA 5 (Raytest, Straubenhardt) als Detektor. Die Messzelle bestand aus einem Lithium-Glas-Szintillator mit einem Volumen von 400 μl . Die Nachweisgrenze lag bei ca. 2500 dpm/ml.

2.4 Messung des Isotopenverhältnisses

Das $\delta^{13}\text{C}$ von CH_4 , CO_2 und Acetat wurde mit einem Gaschromatographen, gekoppelt an ein Isotope Ratio Massenspektrometer, (GC-IRMS; Finnigan, Bremen) bestimmt (Tab. 5).

Die Analysen wurden nach der Methode von Brand (1996) und Sugimoto *et al.* (1991) durchgeführt.

Tab. 7: Betriebsdaten des GC-IRMS.

GC	Hewlett Packard 6890 (Waldbronn)
Injektor	Split / Splitlos (Split : Flow = 10:1)
Säule	<u>Methan/CO₂</u> : Pora Plot Q, 27,5 m (incl. 2,5 m particle trap), Innen-Ø 0,32 mm, Filmdicke 10 µm (Chrompack, Frankfurt) <u>Acetat</u> : FFAP, 30 m, Innen-Ø 0,32 mm, Filmdicke 0,25 µm (J&W Scientific, Folsom, Kanada)
Trärgas	Helium 46, Fluß: 2,6 ml min ⁻¹
Temperatur	Methan/CO ₂ : Injektor 150°C Säule 25°C Acetat: Injektor 240°C Säule: 50°C Starttemperatur (2 min), 20°C/min, 240°C Endtemperatur
GC/C Interface	Standard GC Combustion Interface III (Finnigan, Bremen) Oxidations-Reaktor: 940°C, Reduktions-Reaktor: 650°C
IRMS	Finnigan MAT delta plus (Finnigan, Bremen)
Software	ISODAT™ (Finnigan, Bremen)
Probevolumen	20 µl

Als Arbeitsstandard wurde CO₂ 4.8 , kalibriert gegen Pee Dee Belemnite Carbonat, benutzt. Das Isotopenverhältnis wurde in folgender Schreibweise dargestellt:

$$\delta^{13}\text{C} = 10^3 \left[\frac{(R_a)_{\text{Probe}}}{(R_a)_{\text{Standard}}} - 1 \right]$$

Hierbei ist:

$$R_a = {}^{13}\text{C}/{}^{12}\text{C}$$

Die Präzision war $\pm 0,2\%$ bei wiederholter Injektion von 1,3 nmol CH₄.

Zur Bestimmung des $\delta^{13}\text{C}$ von Acetat wurden jeweils ca. 1 ml tiefgefrorene Porenwasserprobe (siehe 2.2) in einem Gefriertrockner (Alpha 1-4; Christ, Osterode) vollständig getrocknet und anschließend in 20-50 μl Ameisensäure (0,01 M) in Methanol aufgenommen. Die Proben wurden mehrfach homogenisiert und abzentrifugiert, um möglichst viel Acetat wieder in Lösung zu bekommen. Von dieser Lösung wurden 2 μl direkt splitlos injiziert.

Die Isotopensignatur des organischen Materials im Boden wurde vor Inkubationsbeginn an luftgetrockneten Proben bestimmt. Die Messung erfolgte über einen Elementaranalysator, gekoppelt an ein IRMS, und wurde am Institut für Bodenkunde und Waldernährung (IBW), Universität Göttingen, durchgeführt.

2.5 pH-Messung

Der pH in den Bodenaufschlämmungen wurde mit einem pH-Meter (pH 539, WTW) und pH-Elektrode In Lab 427 (Mettler, Toledo) direkt nach dem Öffnen der Serumflaschen gemessen.

3 Bestimmung der hydrolytischen Enzymaktivität

3.1 Potentielle hydrolytische Aktivität

Zur Bestimmung der potentiellen hydrolytischen Aktivität als Initialschritt des anaeroben Abbaus organischer Substanz wurde ein Enzymtest nach Boschker und Cappenberg (1994) angepasst und durchgeführt. Dazu wurden fluoreszenzmarkierte Substrate (Methylumbelliferon-Glucosid (MUF_{Glu}) und Methylumbelliferon-Cellobiosid (MUF_{Cel}) verwendet, die von β -D-Glucosidasen bzw. Exo- β -D-Glucanasen gespalten werden. Das freie Methylumbelliferon (MUF) ist unter alkalischen Bedingungen fluoreszierend und kann fluoreszenzspektroskopisch quantifiziert werden (Hoppe, 1983; Somville und Billen, 1983). Bei der Bestimmung der Glucanase-Aktivität mit MUF_{Cel} kann Gluconolacton (GLN) als Hemmstoff für die Glucosidase-Aktivität benutzt werden, die unspezifisch Cellobiose abspalten kann (Desphande *et al.*, 1984, 1988).

In Vorversuchen mit verschiedenen Probe-Mengen, Substrat-Konzentrationen, Inkubationszeiten und GLN-Konzentrationen wurde das im folgenden aufgeführte Protokoll ermittelt, das weitgehend den Angaben von Boschker und Cappenberg (1994) entspricht.

0,3 ml Bodenaufschlammung wurden in Zentrifugenröhrchen mit 0,5 ml Kalium-Phosphat-Puffer (50 mM, pH 7,0) und 1 ml Substrat (MUF_{Glu} bzw. MUF_{Cel} , 2 mM) versetzt und gründlich homogenisiert. Bei der Bestimmung der Glucanase-Aktivität mit MUF_{Cel} wurde 0,3 ml GLN (330 mM) oder 0,3 H₂O dest. zugegeben, um das gleiche Probenvolumen zu erhalten. Als Verdunstungsschutz wurden die Röhrchen mit Parafilm „M“ (American National Can, Chicago, USA) abgedeckt. Die Inkubation erfolgte für 15 min (MUF_{Glu}) oder 90 min (MUF_{Cel}) bei den gleichen Temperaturen wie die Vorinkubation. Anschließend wurden die Proben sofort auf Eis gesetzt und 5 ml Ethanol (96%) zugegeben (Endkonzentration in der Probe 70%), um die Reaktion zu stoppen und das gebildete MUF zu extrahieren. Die Proben wurden homogenisiert und 20 min bei 5000 rpm abzentrifugiert (Zentrifuge Universal 30 F, Hettich). 4 ml des Überstandes wurden in 1 ml NaOH-Glycin-Puffer (1 M, pH 11,0) überführt. Der hohe pH in der Probe stoppte die Reaktion endgültig und verstärkte die Fluoreszenz des aus den MUF-Substraten freigesetzten MUF. Die erhaltene Lösung wurde im Fluoreszenzspektrometer gemessen (Anregung: 365 nm, Emission: 450 nm; Spectrofluorometer RF-540 mit Data Recorder DR-3, Shimadzu, Kyoto, Japan). Zur Bestimmung der Blindwerte wurde das jeweilige Substrat erst nach der Inkubation und der Ethanolzugabe zugegeben. Als Standards wurde Blindwerten vor der Inkubation verschiedene Konzentrationen eines MUF-Standards zugegeben, um auch eine Absorption von gebildetem MUF an Bodenpartikel bzw. Huminsäuren mit einzuberechnen. Alle Messungen wurden mit 4 Parallelen durchgeführt.

NaOH-Glycin-Puffer

Stammlösung	Glycin	1 M
	NaCl	1 M
NaOH		1 M
Ansatz	512 ml	Stammlösung
	488 ml	NaOH
	<hr/>	
	1000 ml	
	einstellen auf pH 11,0	

3.2 Aktuelle hydrolytische Aktivität

Neben der potentiellen Hydrolyse sollte auch die aktuelle Hydrolyse bestimmt werden, also die *in situ*-Hydrolyserate ohne Zugabe von Substrat. Die Rate der aktuellen Hydrolyse-Aktivität wurde über die Rate der Freisetzung von Monosacchariden im Porenwasser bestimmt. Dazu wurde die Aufnahme von Monosacchariden in die Zelle durch Zugabe von Toluol gehemmt, so dass es zu einer Akkumulation der freiwerdenden Monosaccharide kam (Boschker *et al.*, 1995).

In Vorversuchen mit bei 30°C vorinkubierten Proben wurde nachgewiesen, dass Monosaccharide nach einer Zugabe von 1 bis 10% v/v Toluol unabhängig von der Toluol-Konzentration über einen Zeitraum von mindestens 50 h linear akkumulieren. Für die Versuche wurden, wie von Boschker *et al.* (1995) beschrieben, 3% v/v Toluol eingesetzt.

Zum Start des Experiments wurden 45 µl Toluol pro Probe mit einer Laborspritze (50µl, Unimetrics, Shorewood, Illinois, USA) in die vorinkubierten Serumflaschen injiziert (pro Temperatur 10 Serumflaschen). Die Proben wurden gründlich homogenisiert und weiter inkubiert. In regelmäßigen Abständen (0-50 h) wurde die Inkubation einzelner Flaschen abgebrochen, die Bodenaufschlammungen entnommen und die Konzentration der akkumulierten Monosaccharide mittels HPLC bestimmt.

4 Kulturmedium für die Most Probable Number-Bestimmung

Für die Most Probable Number- (MPN-) Bestimmungen wurde ein bicarbonatgepuffertes, Sulfid-reduziertes Medium verwendet (Huser *et al.*, 1982).

4.1 Lösungen

Lösungen 1-4, 7 und 8 wurden bei Raumtemperatur, Lösung 5, 6 und 9 bei 4°C und die Vitamin-Stammlösung bei -20°C gelagert.

Stammlösungen 1-4:

		g l ⁻¹	mM
1.	KH ₂ PO ₄	27,2	200,0
2.	NaHPO ₄ × 2 H ₂ O	35,6	200,0
3.	NH ₄ Cl	24,0	448,6
	MgCl ₂ × 6 H ₂ O	8,0	39,4
	NaCl	24,0	410,3
4.	NaHCO ₃	80,0	952,4

Saure Spurenelement-Lösung (Lösung 5; Stams *et al.*, 1993):

	g l ⁻¹	mM
HCl (35%)	1,53 ml	50
FeCl ₂ × 4 H ₂ O	1,49	7,5
ZnCl ₂	0,068	0,5
MnCl ₂ × 4 H ₂ O	0,099	0,5
H ₂ BO ₃	0,062	1,0
CoCl ₂ × 6 H ₂ O	0,119	0,5
CuCl ₂ × 2 H ₂ O	0,0134	0,5
NiCl ₂ × 6 H ₂ O	0,024	0,1
H ₂ O dest. ad 1 l		

Das FeCl₂ wurde zunächst in HCl, anschließend in H₂O dest. gelöst. Nach Zufügen der anderen Salze wurde mit H₂O dest. auf 1 l aufgefüllt.

Alkalische Spurenelement-Lösung (Lösung 6; Stams *et al.*, 1993):

	g l ⁻¹	mM
NaOH	0,4	10,0
Na ₂ SeO ₃ × 5 H ₂ O	0,015	0,1
Na ₂ WO ₄ × 2 H ₂ O	0,033	0,1
Na ₂ MoO ₄ × 2 H ₂ O	0,012	0,1

Zunächst wurde das NaOH in H₂O dest. gelöst. Nach Zugabe der anderen Salze wurde mit H₂O dest. auf 1 l aufgefüllt. Der pH sollte bei 6,9 - 7,1 liegen.

Sulfid-Lösung (Lösung 7):

Zunächst wurde destilliertes Wasser mit Hilfe einer Vakuumpumpe entgast. In eine Serumflasche (120 ml) wurde ein Magnetprüher gegeben und die Gasphase gegen N₂ ausgetauscht. 6 g Na₂S × 9 H₂O (240 g l⁻¹) und 25 ml H₂O dest. wurden unter N₂-Fluss zugegeben. Die Serumflasche wurde mit einem Butylgummistopfen verschlossen und die Gasphase erneut gegen N₂ ausgetauscht. Das Sulfid wurde unter Rühren gelöst und die Lösung anschließend autoklaviert (20 min, 121°C).

Resazurin-Lösung (Lösung 8):

0,25 g Resazurin wurden in eine 500 ml Kulturflasche eingewogen und 500 ml H₂O dest. zugegeben (0,5 g l⁻¹).

Vitamin-Lösung (Lösung 9; Wolin *et al.*, 1963):Vitamin-Stammlösung:

Biotin	20 mg
Folsäure	20 mg
Pyridoxin-HCl (Vitamin B6)	100 mg
Thiamin-HCl (Vitamin B1)	50 mg
Riboflavin (Vitamin B2)	50 mg
Nikotinsäure	50 mg
D-Ca-Pantothenat	50 mg
Cyanocobalamin (Vitamin B12)	50 mg
p-Aminobenzoesäure	50 mg
Liponsäure	50 mg
Destilliertes Wasser	1000 ml

Gebrauchslösung (Lösung 9):

4,5 g $\text{CaCl}_2 \times 9 \text{H}_2\text{O}$ wurden in 90 ml entgastem H_2O dest. gelöst. Diese Lösung wurde in eine Serumflasche überführt, die mit einem Butylgummistopfen verschlossen wurde. Die Gasphase wurde gegen N_2/CO_2 (80:20) ausgetauscht. Nach dem Autoklavieren wurden 10 ml der Vitamin-Stammlösung über einen sterilen Filter (0,2 μM) zugegeben.

4.2 Ansatz des Mediums

In 500 ml destilliertem Wasser wurden wie folgt gelöst:

Lösung 8	1,0 ml
Lösung 1	15,0 ml
Lösung 2	15,0 ml
Lösung 3	12,5 ml
Lösung 5	1,0 ml
Lösung 6	1,0 ml
KCl	0,15 g
Hefeextrakt	0,25 g
Na-Acetat (2 M)	0,5 ml

Die Lösung wurde mit H₂O dest. auf 960 ml aufgefüllt und der pH auf 6,8 – 7,0 eingestellt. Jeweils 9 ml Medium wurden in Reagenzgläser (20 ml) bzw. 45 ml in Serumflaschen (120 ml) gefüllt, diese wurden mit Butylgummistopfen verschlossen, die Gasphase gegen H₂/CO₂ (80:20) ausgetauscht und ein Druck von 1,7 bar eingestellt. Anschließend wurden 40 ml Lösung 4 und 1 ml Lösung 7 pro Liter zugegeben. Nach dem Autoklavieren (30 min, 121°C) wurde 1 ml Lösung 9 pro Liter steril zugegeben. Zum Beimpfen wurde nur völlig klares und farbloses Medium verwendet.

5 Molekulare Methoden

DNA-Marker: Smart-Ladder (Eurogentec, Seraing, Belgien)

DNA-Polymerase: AmpliTaq® DNA Polymerase (PE Applied Biosystems, Weiterstadt)

Restriktionsenzym: *TaqI* (Schnittstelle: T↓CGA)

5.1 DNA-Extraktion aus Bodenaufschlammungen

Proben für molekulare Analysen wurden von 60 bis 90 Tage inkubierten Bodenaufschlammungen entnommen (jeweils 3 Parallelen), in 2 ml Reaktionsgefäße überführt und bei –26°C bis zur DNA-Extraktion gelagert. Die DNA-Extraktion wurde in Anlehnung an früher beschriebene Protokolle durchgeführt (Ogram *et al.*, 1987; Smalla *et al.*, 1993; Großkopf *et al.*, 1998a; Chin *et al.*, 1999a).

1 ml Bodenaufschlammung wurden nach dem Auftauen mit 0,5 ml Natrium-Phosphat-Puffer (pH 8,0; 120 mM), 200 µl SDS (Sodium Dodecyl Sulfate; 10%) und 1 g Glasperlen (Ø 0,17 bis 0,18 mm, B. Braun, Melsungen) versetzt. Nach 10 min Inkubation (65°C) und zweimal 1 min hochtourigem Schütteln (2.400 rpm; Mikro-Dismembrator S, B. Braun, Melsungen) wurden die Proben abzentrifugiert (10 min; 13.000 × g, 4°C; Mikro 22R, Hettich). Der wässrige Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit einem Volumen Chloroform-Isoamyl-Alkohol (24:1 v/v) versetzt, 1 min geschüttelt und danach 3 min zentrifugiert (13.000 × g, 20°C). Dieser Vorgang wurde noch zweimal wiederholt. Der Überstand wurde in einem neuen Reaktionsgefäß gesammelt und mit 0,1 Volumen Na-Acetat (3 M, pH 5,3) und 2 Volumen Ethanol (100%) versetzt. Nach 1 h Inkubation bei RT

wurden die Proben 20 min zentrifugiert ($13.000 \times g$, 20°C). Das Pellet wurde mit $500 \mu\text{l}$ 70%-igem Ethanol versetzt und für 10 min zentrifugiert ($13.000 \times g$, 20°C). Das Pellet wurde für ca. 5 min getrocknet (DNA Speed Vac® DNA110, Savant Instruments, Holbrook, NY) und anschließend in $200 \mu\text{l}$ TE-Puffer (Tris-HCl, 10mM, pH 8,0; Na₂EDTA, 1,0 mM; Sambrook *et al.*, 1989) aufgenommen. Nach Inkubation über Nacht (4°C) wurden die unlöslichen Partikel für 5 min pelletiert ($13.000 \times g$, 4°C). Die $200 \mu\text{l}$ DNA-Lösung wurden mit 0,2 g Cäsiumchlorid versetzt, gut gemischt und 3 h bei RT inkubiert. Zwischendurch wurde der Ansatz immer wieder geschüttelt. Nach einer Zentrifugation für 20 min ($13.000 \times g$, 20°C) wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit deionisiertem Wasser auf 1 ml aufgefüllt und mit $600 \mu\text{l}$ Isopropanol versetzt. Nach 1 h bei Raumtemperatur wurde der Ansatz 15 min zentrifugiert ($13.000 \times g$, 20°C). Das Pellet wurde getrocknet (3 min; DNA Speed Vac®) und anschließend in $100 \mu\text{l}$ TE-Puffer resuspendiert. Zur Kontrolle wurden $10 \mu\text{l}$ DNA-Lösung zusammen mit Smart Ladder (Eurogentec, Seraing, Belgien) als Längenstandard in einem 1%-igen Agarosegel aufgetrennt.

5.2 Gelelektrophorese

Zur Abschätzung der extrahierten DNA-Mengen wurden $10 \mu\text{l}$ -Aliquots der DNA-Lösungen auf ein 1%-iges TAE-Agarosegel aufgetragen. Zuvor wurden die Proben mit 0,2 Volumen Auftragspuffer vermischt. Die Auftrennung erfolgte in einer mit $1 \times$ TAE-Puffer gefüllten Gelkammer für ca. 1 h bei 110 V. Als Größenstandard wurde Smart Ladder (Eurogentec, Seraing, Belgien) aufgetragen. Das Gel wurde in einer 0,005%-igen Ethidiumbromid-Lösung (v/v) gefärbt und mit einer Video-Kamera (Gel Print 2000i, BioPhotonics Corporation, Ann Arbor, USA) aufgenommen.

Tris-Acetat-EDTA (TAE)-Puffer (Sambrook *et al.*, 1989)

Tris-HCL, pH 8,0	40,00 mM
Natriumacetat	8,30 mM
EDTA	0,38 mM
mit Essigsäure auf pH 7,8 eingestellt	

Auftragspuffer

Saccharose	40,00% Vol.
Bromphenolblau	0,25% Vol.
Xylencyanol FF	0,25% Vol.
Orange G2	0,25% Vol.

5.3 Amplifikation der 16S rRNA Gene mit Archaea-spezifischen Primern

In der PCR wird ein durch das Primerpaar festgelegter Bereich der DNA exponentiell vermehrt. Pro PCR-Ansatz wurden in einem 0,2 ml Reaktionsgefäß folgende Substanzen zusammenpipettiert:

H ₂ O dest. (DNAase-frei)	70,5 µl
10 × Puffer II (PE Applied Biosystems, Weiterstadt)	10,0 µl
Magnesiumchlorid (25 mM)	6,0 µl
Desoynukleotidtriphosphate (20 nM/Nukleotid)	10,0 µl
Forward Primer (30 pM)	1,0 µl
Reverse Primer (30 pM)	1,0 µl
<i>Taq</i> DNA-Polymerase (5 Units/µl)	0,5 µl
DNA-Lösung	1,0 µl
Gesamtvolumen	100,0 µl

Das folgende Primerpaar wurde für die Amplifikation der 16S rDNA-Fraktion der DNA-Proben benutzt (Großkopf *et al.* 1998a):

Primer-Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'
A109f	ACKGCTCAGTAACACGT
A934b	GTGCTCCCCCGCCAATTCCT

Diese amplifizieren von Position 109 bis 934 (Escherichia coli 16S rRNA-Nummerierung (Brosius *et al.*, 1978), beschrieben in Chin *et al.* 1999a). Der PCR-Ansatz wurde in den

Thermo-Cycler GeneAmp PCR System 2400 (Perkin-Elmer, Langen) gestellt und das folgende Programm gestartet:

Nr.	Temperatur	Dauer	Funktion
1	94°C	4 min	anfängliche Denaturierung
2	52°C	1 min	Primer-Anlagerung
3	72°C	2 min	DNA-Synthese
4	94°C	1 min	Denaturierung
5	52°C	1 min	Primer-Anlagerung
6	72°C	6 min	DNA-Synthese
7	4°C	∞	Kühlprogramm

Die Schritte 2 bis 4 wurden 28 mal (37-50°C-Proben) bzw. 32 mal (10-37°C-Proben) wiederholt. Zur Kontrolle des PCR-Produkts wurden 10 µl zusammen mit dem Smart Ladder-Längenstandard (Eurogentec, Seraing, Belgien) in einem 1%-igen Agarosegel aufgetrennt.

5.4 T-RFLP-Analyse

Das Prinzip der T-RFLP-Analyse wurde zuerst von Liu *et al.* (1997) beschrieben. Dabei wird der Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus amplifizierter und anschließend verdauter Gene untersucht. Die Analyse wurde in Anlehnung an das Protokoll von Chin *et al.* (1999a) durchgeführt.

Der für die PCR benutzte Reverse-Primer wurde am 5'-Ende mit FAM (5-Carboxyfluoreszein) markiert. Nach dem Restriktionsverdau wurden die Restriktionsfragmente elektrophoretisch getrennt und die FAM-markierten terminalen Fragmente der 16S-rDNA analysiert.

Zum Entfernen der Salze, Enzyme, Nukleotide und Primer wurden die aus der PCR resultierende 16S rDNA-Amplifikate mit dem QIAquick™ PCR purification kit (Qiagen, Hilden) nach Anweisung des Herstellers aufgereinigt. Aliquots der gereinigten 16S rDNA wurden mit *TaqI* (Promega, Mannheim) 3 h bei 65°C im Techne Thermoblock DB-2D (Wertheim/Main) verdaut. Jedes Reaktionsgefäß enthielt 2 bis 6 µl der 16S rDNA

Amplifikate, 1 µl Inkubations-Puffer, 1 µl Restriktionsenzym (10 Units) und wurde mit deionisiertem Wasser auf 10 µl ergänzt. 2,5 µl der verdauten 16S rDNA wurden mit 2 µl Formamid und 0,5 ml eines internen Längenstandards, bestehend aus 17 verschiedenen 6-Carboxy-X-Rhodamin- (ROX-) markierten Fragmenten mit einer Länge von 29 bis 928 Nukleotiden (GeneScan-1000 ROX, PE Applied Biosystems), gemischt. Die Proben wurden bei 94°C denaturiert (3 min) und bis zum Beladen des Gels auf Eis gestellt. Zur Trennung wurden die 5 µl Probe auf ein 5%-iges denaturierendes Polyacrylamidgel (12 cm) aufgetragen und anschließend in dem automatischen DNA-Sequencer ABI 373A (PE Applied Biosystems, Weiterstadt) aufgetrennt. Die Laufbedingungen waren: 2.400 V, 40 W, 27 mA, 6 h Laufzeit. Als Laufpuffer wurde 1 × TBE-Puffer verwendet. Die Auswertung der fluoreszenzmarkierten Fragmente erfolgte mit der GENESCAN 672 Software Version 2.1 (PE Applied Biosystems).

Polyacrylamid-Gel

Acrylamid/Bisacrylamid (29:1)	5,0% w/v
10 × TBE-Puffer	10,0% v/v
Harnstoff	8,3 M

TBE-Puffer

Tris-HCl, pH 8,0	89 mM
Borat	89 mM
Na ₂ EDTA	2 mM

6 Inkubationsexperimente

6.1 Ansatz der Bodenaufschlammungen

Für alle Experimente wurde der trockene Boden mit einer Backenmühle zerkleinert und auf 2 mm gesiebt. Die Bodenproben wurden im Verhältnis 1:1 mit bidestilliertem, autoklaviertem und entlüftetem Wasser suspendiert und die Probengefäße mit Butylgummi-Stopfen verschlossen. Sofort im Anschluss wurden die Proben mindestens 10 mal im Wechsel mit einer Membranpumpe (Vacuubrand, Wertheim) evakuiert und mit N₂ begast. Anschließend wurde ein Druck von 1,2 bar eingestellt.

6.2 Experimente am Thermoblock

Um möglichst hochauflösend über einen größeren Temperaturbereich Proben zu inkubieren, wurde ein Thermoblock eingesetzt. Dieser bestand aus einem 185 cm langen isolierten Aluminium-Block, an einem Ende elektrisch beheizt, am anderen gekühlt. Der Block enthielt 4 Reihen mit je 31 Bohrungen für Reagenzgläser (Isaksen *et al.*, 1994; Arnosti *et al.*, 1998).

Für Versuche am Thermoblock wurden verschraubbare Reagenzgläser (16 ml, Ochs, Göttingen) mit 3 g trockenem Boden und 3 ml Wasser versetzt, mit Butylgummi-Stopfen verschlossen, verschraubt und mit N₂ begast. Um methanogene Bedingungen zu erreichen, wurden die Proben zunächst für zwei Tage bei 30°C vorinkubiert (Kontrolle: Methanproduktion setzte nach zwei Tagen ein). Danach wurden die Proben im Thermoblock auf den Temperaturbereich 10-80°C verteilt (Abstand: 1,0 bis 2,6°C; 4 Parallelen). Gasmessungen wurden wöchentlich durchgeführt. Vor den Messungen wurden die Serumflaschen für 30 sek. kräftig geschüttelt, um ein Gleichgewicht zwischen Bodenaufschlammung und Gasphase zu erreichen. Am Ende des Versuchs (nach 89 bzw. 127 Tagen) wurden in den Bodenaufschlammungen die Konzentration an organischen Säuren sowie der pH bestimmt. Einige Proben wurden für DNA-Extraktionen verwendet. Parallel wurden Proben in 60 ml Serumflaschen bei 10, 25 und 37°C inkubiert (10 g Boden + 10 ml Wasser). Hieraus wurden wöchentlich Porenwasserproben für HPLC-Analysen entnommen (3 Parallelen).

6.3 Versuche unter Steady-State-Bedingungen

Die übrigen Inkubationsexperimente wurden unter Steady-State-Bedingungen durchgeführt. Dazu wurden 60 ml Serumflaschen (Ochs, Göttingen) mit 10 g trockenem Boden und 10 ml Wasser versetzt, mit Butylgummi-Stopfen verschlossen, mit Aluminium-Kappen gesichert und mit N₂ begast. Anschließend erfolgte eine Vorinkubation bei 10, 15, 20, 25, 30 und 37°C für 60-90 Tage. Wenn nicht anders angegeben, wurde vor Beginn der folgenden Experimente die Gasphase der Proben wie oben beschrieben erneut durch N₂ ausgetauscht, um sämtliches CH₄ und CO₂ zu entfernen.

6.3.1 Versuche mit radioaktiv markierten Substraten

6.3.1.1 Zugabe von ^{14}C -Bicarbonat

Um den Anteil von H_2/CO_2 an der Methanproduktion abzuschätzen, wurde pro Probe ca. $1,5 \mu\text{Ci } ^{14}\text{C}$ -markiertes Bicarbonat (ca. $5 \times 10^4 \text{ Bq}$) zugegeben (2 Versuche à 3 bzw. 5 Parallelen). Die Inkubation erfolgte bei den gleichen Temperaturen wie die Vorinkubation. Anschließend wurde in regelmäßigen Abständen Methan und CO_2 in der Gasphase gemessen. Über den f -Faktor (Berechnung siehe 7.3.1) konnte der Anteil der hydrogenotrophen Methanproduktion an der Gesamtmethanbildung abgeschätzt werden.

6.3.1.2 Markierung mit $2\text{-}^{14}\text{C}$ -Acetat, $2\text{-}^{14}\text{C}$ -Propionat und $\text{U-}^{14}\text{C}$ -Glucose (Versuche durchgeführt von Tanja Hoffmann)

Für die Experimente mit radioaktiv markiertem Acetat, Propionat und Glucose wurden 250 ml Bodenaufschlammungen in 500 ml Kulturflaschen (Schott) für ca. 30 Tage bei 15 bzw. 30°C anaerob vorinkubiert (Ansatz wie oben beschrieben). Aus diesen Flaschen wurden jeweils 30 ml Aufschlammung in 120 ml Serumflaschen transferiert. Diese wurden verschlossen und die Gasphase durch N_2 ausgetauscht (siehe oben) und dann für weitere 5 Tage bei 15 bzw. 30°C inkubiert, um wieder Gleichgewichtsbedingungen zu erreichen.

Zum Start der Experimente wurden $0,94 \mu\text{Ci}$ (ca. $3,5 \times 10^4 \text{ Bq}$) $2\text{-}^{14}\text{C}$ -Acetat, $1,03 \mu\text{Ci}$ (ca. $3,8 \times 10^4 \text{ Bq}$) $2\text{-}^{14}\text{C}$ -Propionat oder $2,2 \mu\text{Ci}$ (ca. $8,2 \times 10^4 \text{ Bq}$) $\text{U-}^{14}\text{C}$ -Glucose in die Serumflaschen injiziert (je 2 Parallelen). Anschließend wurde in regelmäßigen Abständen Methan und CO_2 in der Gasphase sowie ^{14}C -markierte Fettsäuren und Glucose und die Poolgrößen von Acetat und Propionat in Porenwasserproben bestimmt. Die Poolgröße von Glucose im Porenwasser wurde von Dr. Rainer Ruser, GSF, Neuherberg, bestimmt.

6.3.1.3 Bilanzierung der Radioaktivversuche

Nach Beendigung der Experimente wurde 1 ml H_2SO_4 (1 M) pro Probe zugegeben, um das gelöste Methan und CO_2 vollständig auszutreiben. Dann wurde gaschromatographisch die Restaktivität ($\text{CH}_4 + \text{CO}_2$) in der Gasphase bestimmt. Zusätzlich wurden Proben der Bodensuspension entnommen (1 ml), in 1 ml Reaktionsgefäße (Eppendorf, Hamburg) überführt und abzentrifugiert (10 min, 14.000 rpm). Aus $100 \mu\text{l}$ des Überstandes wurde im Szintillationszähler die Restaktivität des Porenwassers bestimmt. Die Bilanzierung der

markierten Substrate erfolgte durch Addition der Aktivität der entnommenen Porenwasser- und Gasproben, zuzüglich der Restaktivität in der Gasphase und im Porenwasser.

6.3.2 $\delta^{13}\text{C}$ -Isotopenverhältnis

Als eine zweite Methode um Aufschluß über die Herkunft des produzierten Methans zu erhalten, wurde das $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ -Isotopenverhältnis ($\delta^{13}\text{C}$) von Methan und CO_2 in der Gasphase (5 Parallelen) sowie die Acetat-Konzentration im Porenwasser (3 Parallelen) von im Steady State befindlichen Proben im GC-IRMS bestimmt. Hierfür wurde die Gasphase der Proben nicht ausgetauscht. Zusätzlich wurde das $\delta^{13}\text{C}$ der organischen Substanz des luftgetrockneten, nicht inkubierten Bodens am Institut für Bodenkunde und Waldernährung, Universität Göttingen, bestimmt.

6.3.3 Bestimmung der Hydrolyse-Aktivität

Um Aussagen über die Geschwindigkeit des Initialschritts des Abbaus organischer Substanz im Boden zu erhalten, wurde die Aktivität extrazellulärer hydrolytischer Enzyme bestimmt. Die Aktivität dieser Enzyme resultiert in der Freisetzung von Monosacchariden (z.B. Glucose bei der Hydrolyse von Zellulose), die von Fermentierern in die Zelle aufgenommen und verwertet werden können.

Die Potentielle Hydrolyse erfasst die maximale Aktivität der Endo-(1,4)- β -Glucanase und der (1,4)- β -Glucosidase unter substratgesättigten Bedingungen. Der Versuch wurde mit 60-90 Tage vorinkubierten Proben zweimal durchgeführt (4 Parallelen; siehe Kapitel 3.1).

Zur Bestimmung der aktuellen Hydrolyserate wurden pro Temperatur 10 Proben mit Toluol versetzt. Die Hydrolyserate wurde aus der linearen Glucose-Akkumulation über maximal 50 h bestimmt (siehe Kapitel 3.2).

6.3.4 Bestimmung der potentiellen Methanogenese

Um Aussagen über limitierende Schritte im methanogenen Abbau zu bekommen, wurde die potentielle Methanproduktion aus verschiedenen Substraten bestimmt. Die benutzten Substrate waren Glucose, Propionat, Acetat und H_2 . Durch den Versuch mit H_2 sollte gleichzeitig die Methanogenese von den vorhergehenden mikrobiellen Prozessen abgekoppelt werden, was zu einer Akkumulation der Intermediate führt.

Für Glucose, Propionat und Acetat wurde in Vorversuchen die Substratkonzentration bestimmt, die die Methan-Produktion am stärksten stimuliert. Dazu wurde bei 30°C vorinkubierten Bodenaufschlammungen eine Konzentration von 0,15; 1,5; 15 und 150 mM des jeweiligen Substrats (bezogen auf den Wassergehalt der Bodenaufschlammungen) eingestellt und die Methanproduktion gemessen. Die stärkste Stimulation der Methan-Bildung wurde für Glucose und Acetat mit 15 mM Substrat und für Propionat mit 1,5 mM erzielt. Diese Konzentrationen wurden im Versuch eingesetzt. In weiteren Vorversuchen wurde die Stimulation mit H₂ und H₂/CO₂ (8:2) getestet. Es zeigte sich, dass beide Varianten in einer gleich großen Stimulierung der Methan-Bildung resultierten. Nach 3-4 Tagen kam es unter H₂/CO₂ zu einem starken Anstieg der Methanbildung, was auf ein Wachstum der hydrogenotrophen methanogenen Population schließen ließ. Da das Ziel die Bestimmung der maximalen Methanbildung aus dem Substrat durch die aktuell vorhandene Population (ohne Wachstum) war, wurde das Experiment mit einer Gasphase aus reinem H₂ durchgeführt. Als Kontrolle dienten Proben mit N₂ als Gasphase.

Für die Versuche wurden 60-90 Tage vorinkubierte Serumflaschen benutzt, deren Gasphase direkt vor Versuchsbeginn durch N₂ ausgetauscht wurde. Nach Zugabe der entsprechenden Substrate wurde regelmäßig CH₄, CO₂ und H₂ in der Gasphase (5 Parallelen) und Fettsäuren sowie Glucose im Porenwasser (3 Parallelen) bestimmt.

6.4 Bestimmung der Zellzahl H₂/CO₂-verwertender Methanogener (MPN)

MPN-Bestimmungen wurden mit bei 10, 25 und 37°C für 60 bis 90 Tage vorinkubierten Bodenaufschlammungen durchgeführt. Um Unterschiede zwischen den Temperaturen sehen zu können, wurden 1:2 Verdünnungen und 8 Parallelen gewählt. Zum Ansetzen wurden die Serumflaschen mit Bodenaufschlammung homogenisiert, geöffnet, 5 ml der Aufschlammung steril entnommen und in die zuvor geöffnete Serumflasche mit Medium (45 ml) überführt. Diese wurde wieder verschlossen und die Gasphase steril gegen H₂/CO₂ ausgetauscht. Nach gründlichem Homogenisieren wurden 5 ml des beimpften Mediums mit einer sterilen Spritze entnommen und damit die nächste Serumflasche beimpft. Auf diese Weise wurden alle weiteren Verdünnungsschritte durchgeführt. Nach fünf 1:10 Verdünnungen wurden weitere sechs 1:2 Verdünnungen vorgenommen, indem jeweils 9 ml beimpftes Medium in Reagenzgläser mit 9 ml Medium überführt wurden.

Die beimpften Medien wurden bei den entsprechenden Temperaturen (10, 25, 37°C) für 7 bzw. 9 Monate (25 und 37°C bzw. 10°C) inkubiert und durch regelmäßige Methan-Messungen auf methanogene Aktivität überprüft. Proben mit >50 ppm Methan in der Gasphase wurden als positiv gewertet. Die Zellzahlen wurde nach den MPN-Tabellen in Rowe *et al.* (1977) berechnet.

6.5 Analyse der methanogenen mikrobiellen Gemeinschaft

Proben für DNA-Extraktion, Amplifikation und anschließende T-RFLP-Analyse wurden aus 60-90 Tage vorinkubierten Serumflaschen (10-37°C) bzw. aus 89 Tage inkubierten Thermoblockröhrchen (37-50°C) entnommen (je 3 Parallelen).

Die T-RFLP-Analyse wurde benutzt, um die relativen Abundanzen der verschiedenen terminalen Restriktionsfragmente (T-RFs) zu berechnen. In die Berechnung wurden alle Peaks >1% der Gesamt-Peakfläche einbezogen. Die Zuordnung der T-RFs zu den entsprechenden phylogenetischen Linien erfolgte nach Chin *et al.* (1999a) und Lüders und Friedrich (2000).

7 Berechnungen

7.1 Ratenberechnungen

Zur Berechnung der Methan-Produktionsraten wurden die Partialdrücke [Pa] in Stoffmenge [μmol] umgerechnet. Dazu wurde die allgemeine Gasgleichung wie folgt umgeformt:

$$n = \frac{p \times V}{R \times T} \quad (1)$$

n: Stoffmenge [mol]

p: Partialdruck des Gases in [bar]

V: Volumen der Gasphase im Probengefäß [l]

R: Gaskonstante (0,083144 [l bar K⁻¹ mol⁻¹])

T: Temperatur [°K]

Das Ergebnis wurde auf g Trockengewicht bezogen. Aus den Steigungen der Stoffmenge im Steady-State (linearer Anstieg) wurde die Produktionsrate errechnet und in $\text{nmol g}^{-1} \text{TS h}^{-2}$ angegeben.

7.2 Berechnung der Aktivierungsenergie

Um einen vergleichbaren Parameter für den Einfluss der Temperatur auf die Methanbildung zu erhalten, wurde die Aktivierungsenergie berechnet. Dazu wurde die Arrhenius-Gleichung verwendet (Sass *et al.*, 1991):

$$P = A e^{-E_a/RT} \quad (2)$$

P: Methan-Produktionsrate [$\text{mol CH}_4 \text{ g}^{-1} \text{TB h}^{-1}$]

A: präexponentieller Faktor [$\text{mol CH}_4 \text{ g}^{-1} \text{TB h}^{-1}$]

E_a : Aktivierungsenergie [kJ mol^{-1}]

R: Gaskonstante [$8,31 \text{ kJ mol}^{-1} \text{K}^{-1}$]

T: Temperatur [$^{\circ}\text{K}$]

Im Diagramm wurde $\ln(P)$ gegen die Temperatur ($1000/T$) aufgetragen. Die Steigung entsprach $10^{-3} E_a/R$, woraus E_a bestimmt wurde.

7.3 Thermodynamikberechnungen

Für die Berechnung der freien Enthalpien (Gibbsche freie Energien, ΔG) wurden die Konzentrationen der Gase und gelösten Komponenten, der pH unter Steady-State-Bedingungen und die jeweilige Inkubationstemperatur aus dem Thermoblockversuch verwendet. ΔG wurde für die Methanogenese aus H_2/CO_2 bzw. Acetat sowie für die Homoacetogenese aus H_2/CO_2 berechnet (Conrad *et al.*, 1986). Die Gibbsche freie Standard-Enthalpie (ΔG^0 ; Tab. 8) wurde aus den Änderungen der freien Bildungsenthalpien (ΔG^0_f) der Reaktanten und Produkte berechnet (Thauer *et al.*, 1977). Die ΔH^0 -Werte (Tab. 8) wurden aus den Enthalpien der Bildung (H_f^0) der Reaktanten und Produkte (Lange, 1979; Stumm und Morgan, 1996) berechnet. Die Änderung der Standard-

Entropie (ΔS^0 ; Tab. 8) leitete sich aus ΔG^0 , ΔH^0 und der Standard-Temperatur ($T=298,14^\circ\text{K}$) ab:

$$\Delta S^0 = \frac{\Delta H^0 - \Delta G^0}{T} \quad (3)$$

Die Anpassung der freien Enthalpie der Reaktionen unter Standardbedingungen (ΔG^0) an die aktuelle Temperatur (ΔG_T^0) wurde nach der Van't Hoff-Gleichung (Conrad und Wetter, 1990) berechnet:

$$\Delta G_T^0 = \Delta G^0 - \Delta S^0 \times T \quad (4)$$

ΔS^0 : Änderung der Entropie

T: Temperatur [K]

Die freie Reaktionsenthalpie unter Versuchsbedingungen (ΔG) wurde mit Hilfe der Nernst-Gleichung und den tatsächlichen Partialdrücken [bar] und Konzentrationen [M] berechnet.

$$\Delta G = \Delta G_T^0 + R \times T \times \ln \frac{[\text{Produkte}]}{[\text{Edukte}]} \quad (5)$$

Tab. 8: Reaktionsenthalpien und –entropien verschiedener Reaktionen unter Standardbedingungen (kJ).

Reaktion	ΔG^0	ΔH^0	ΔS^0
	(kJ pro Reaktion)		
Methan-Produktion			
$4 \text{ H}_2 (\text{g}) + \text{CO}_2 (\text{g}) \rightarrow \text{CH}_4 (\text{g}) + 2 \text{ H}_2\text{O} (\text{l})$	-130.7	-252.9	-0.41
$\text{CH}_3\text{COO}^- (\text{aq}) + \text{H}^+ (\text{aq}) \rightarrow \text{CH}_4 (\text{g}) + \text{CO}_2 (\text{g})$	-75.7	+17.7	+0.314
Homoacetogenese			
$4 \text{ H}_2 (\text{g}) + 2 \text{ CO}_2 (\text{g}) \rightarrow \text{CH}_3\text{COO}^- (\text{aq}) + \text{H}^+ (\text{aq}) + 2 \text{ H}_2\text{O} (\text{l})$	-55.1	-270.6	-0.723

7.4 Berechnungen zu den Radioaktivversuchen

7.4.1 Anteil der H₂/CO₂-abhängigen Methanbildung

Zunächst wurde für jede ¹⁴C-Messung die spezifische Radioaktivität (SR; Verhältnis aus markierter zu unmarkierter Substanz) von CH₄ und CO₂ berechnet (Schütz *et al.*, 1989).

Beispiel:

$$SR_{CH_4} = \frac{{}^{14}CH_4}{CH_4} \quad (6)$$

$${}^{14}CH_4: \text{ in [cps ml}^{-1}\text{]}$$

$$CH_4: \text{ in [}\mu\text{mol ml}^{-1}\text{]}$$

Aus dem Verhältnis der spezifischen Radioaktivität von Methan und CO₂ lässt sich die Fraktion (*f*), also der Anteil des aus markiertem Bicarbonat gebildeten Methans an der gesamten Methanogenese, berechnen:

$$f_{H_2/CO_2} = \frac{SR_{CH_4}}{SR_{CO_2}} \quad (7)$$

7.4.2 Berechnung des respiratorischen Index (RI)

Der respiratorische Index ist ein Maß für den Anteil des markierten C des Substrats, der zu CO₂ bzw. CH₄ umgesetzt wird. Die Berechnung erfolgt nach folgender Formel:

$$RI = \frac{{}^{14}CO_2}{{}^{14}CO_2 + {}^{14}CO_2} \quad (8)$$

Für ¹⁴CO₂ und ¹⁴CO₂ wurden die Aktivitäten in cps eingesetzt.

7.4.3 Berechnung der Umsatzraten ^{14}C -markierter Substrate

Zur Berechnung der Umsatzzeit von $2\text{-}^{14}\text{C}$ -Acetat, $2\text{-}^{14}\text{C}$ -Propionat und $\text{U-}^{14}\text{C}$ -Glucose wurden die Substrat-Aktivitäten zunächst logarithmiert (\ln). Im linearen Bereich der entstehenden Kurve wurde die Steigung ermittelt. Der Betrag dieser Steigung gibt die Umsatzkonstante k wieder. Die Umsatzzeit ist der reziproke Wert der Umsatzkonstante:

$$T_t = \frac{1}{k} \quad (9)$$

T_t : Umsatzzeit (h^{-1})

K : Umsatzkonstante

Durch Multiplikation der gemessenen Substratkonzentration im Porenwasser c_{Substrat} mit der Umsatzkonstanten wurde die Umsatzrate berechnet:

$$V_{\text{Substrat}} = k \times c_{\text{Substrat}} \quad (10)$$

V_{Substrat} : Umsatzrate ($\mu\text{M h}^{-1}$)

c_{Substrat} : Substratkonzentration (μM)

7.5 Berechnung der Isotopensignatur

Durch die Bestimmung von $\delta^{13}\text{CH}_4$, $\delta^{13}\text{CO}_2$ und $\delta^{13}\text{C}$ -Acetat lässt sich ein Hinweis auf die Anteile der Substrate an der Methanogenese bekommen. Dazu wurden die Fraktionierungsfaktoren berechnet (Whiticar *et al.*, 1986):

$$\alpha = \frac{(\delta^{13}\text{C-Substrat} + 1000)}{(\delta^{13}\text{CH}_4 + 1000)} \quad (11)$$

α : Fraktionierungsfaktor für CO_2 oder Acetat

$\delta^{13}\text{C}$ -Substrat: $\delta^{13}\text{CO}_2$ bzw. $\delta^{13}\text{C}$ -Acetat

7.6 Berechnung des gelösten CO₂

Für die Bilanzierung der Substratversuche wurde der Gesamt-CO₂-Pool eingerechnet. Dazu wurde die Summe des gelösten CO₂ (CO₂ + Bicarbonat) benötigt, die im Folgenden als ΣCO_2 bezeichnet wird. Die Konzentration von ΣCO_2 wurde wie folgt berechnet (abgeleitet nach Stumm und Morgan, 1996):

$$[\Sigma\text{CO}_2] = \frac{p\text{CO}_2 \times \alpha_{\text{CO}_2} \times (K_1 + [\text{H}^+])}{V_0 \times [\text{H}^+]} \quad (12)$$

$[\Sigma\text{CO}_2]$: Summe des gelösten CO₂ [M]

$p\text{CO}_2$: CO₂-Partialdruck [bar/1 bar]

α_{CO_2} : Bunsenkoeffizient für CO₂ (Encyclopédie des gaz, 1976)

K_1 : Dissoziationskonstante [mol/l] (Stumm und Morgan, 1996)

V_0 : Molvolumen idealer Gase [l/mol]

$[\text{H}^+]$: Protonenkonzentration [M]

7.7 Bilanzierung der Substratversuche

Für die Versuche zur Stimulierung der Methanogenese durch Zugabe von Glucose, Propionat, Acetat und H₂ wurden eine Kohlenstoff- und eine Elektronenbilanz (O/R-Bilanz) berechnet (Gottschalk, 1986). In die Bilanzierung gingen alle nachweisbaren Intermediate sowie CH₄ und Gesamt-CO₂ inklusive ΣCO_2 ein und es wurden die im Kontrollversuch ermittelten jeweiligen Konzentrationen abgezogen. Die C-Bilanz des H₂-Versuchs wurde unter Einbeziehung der CH₄- und CO₂-Bildung (sowie Acetat) und gegen den C-Fluss (CH₄- und CO₂-Akkumulation) der Kontrolle berechnet.

7.8 Zellzahlschätzung hydrogenotropher Methanogener

Aus den Daten des Thermoblockversuchs sowie dem Anteil der H₂/CO₂-abhängigen Methanbildung ($f_{\text{H}_2/\text{CO}_2}$) sollte die maximale Zellzahl hydrogenotropher Methanogener unter aktuellen Bedingungen abgeschätzt werden. Diese Abschätzung wurde auf Basis der

„maintenance energy“ (Erhaltungsenergie) der Methanogenen durchgeführt und gibt die Zellzahl an, die unter Gleichgewichtsbedingungen (kein Wachstum) vorhanden sein kann. Durchgeführt wurde die Berechnung nach Harder (1997) wie folgt. Zunächst wurde die Rate der Methanbildung aus H_2/CO_2 berechnet:

$$P_{H_2/CO_2} = V_{CH_4} \times f_{H_2/CO_2} \quad (13)$$

P_{H_2/CO_2} : Rate der H_2 -abhängigen Methanbildung [$mol\ CH_4\ h^{-1}\ g^{-1}\ TB$]

V_{CH_4} : Rate der CH_4 -Produktion [$mol\ CH_4\ h^{-1}\ g^{-1}\ TB$]

Die maintenance energy m_e wurde nach Tjihuis *et al.* (1993) berechnet:

$$m_e = 3,3 e^{-69.400/R \times (1/T - 1/298,15)} \quad (14)$$

m_e : Erhaltungsenergie („maintenance energy“) [$kJ\ C\text{-}mol^{-1}\ h^{-1}$]

R: Gaskonstante ($8,31\ [kJ\ mol^{-1}\ K^{-1}]$)

T: Temperatur [$^{\circ}K$]

Aus der maintenance energy, der Gibbschen freien Energie, der Methanproduktionsrate aus H_2/CO_2 und dem C-Gehalt pro Zelle konnte die potentielle Zellzahl errechnet werden (Harder, 1997):

$$MPN = \frac{P_{H_2/CO_2}}{\delta} \times \frac{(-\Delta G)}{m_e} \quad (15)$$

MPN: H_2/CO_2 abhängige Methanogene [$Zellen\ g^{-1}\ TB$]

δ : Umrechnungsfaktor ($4 \times 10^{-14}\ c\text{-}mol\ Biomasse\ Zelle^{-1}$)

III. Ergebnisse

1 Einfluss der Temperatur auf die Methanbildung und die daran beteiligte mikrobielle Gemeinschaft im physiologischen Temperaturbereich

Die vorliegenden Ergebnisse sind zum großen Teil in der Veröffentlichung „The effect of temperature on carbon and electron flow and on the archaeal community in methanogenic rice field soil“ publiziert (siehe Anhang A). Hier sollen lediglich die wichtigsten Ergebnisse sowie einige zusätzliche Daten vorgestellt werden.

1.1 Ausbildung eines Steady-State

Um Informationen über den Einfluss der Temperatur zu bekommen, wurden Bodenaufschlämmungen aus italienischem Reisfeldboden anaerob bei 10 bis 37°C im Thermoblock inkubiert. Zuvor wurden die Proben zwei Tage bei 30°C vorinkubiert, um methanogene Bedingungen zu erreichen. Nach dieser Zeit startete die Methanproduktion und die Proben wurden im Thermoblock weiter inkubiert. Abb. 2 zeigt beispielhaft den Zeitverlauf der Inkubation bei 10°C und 37°C. Direkt mit dem Beginn der Vorinkubation startete die Akkumulation von CO₂ und erreichte bei 10°C mit dem Ende der Vorinkubation eine stabile aber sehr geringe Rate. Gleichzeitig waren Initialpeaks von H₂ und Acetat zu beobachten. Der Wasserstoffpartialdruck nahm schon innerhalb von 24 Stunden wieder ab, weshalb bei 37°C kein Initialpeak zu sehen war, und erreichte innerhalb weniger Tage einen stabilen Partialdruck. Der Abbau von Acetat dauerte 25 Tage (37°C, Abb. 2 B) bis 50 Tage (10°C, Abb. 2 A) bevor eine konstante Konzentration erreicht wurde. Andere organische Säuren, wie Propionat, Lactat, Iso-Butyrat, Butyrat, Iso-Valerat, Valerat und Caproat verschwanden innerhalb von 30 Tagen nach Inkubationsbeginn (nicht dargestellt). Bei 37°C verringerte sich nach dieser Zeit die CO₂-Akkumulation und erreichte eine stabile Rate. Methan wurde bei 10°C zunächst mit geringer Rate produziert, die aber nach ca. 60 Tagen anstieg und ab Tag 90 konstant blieb. Bei 37°C folgte auf einen sehr steilen Anstieg der Methan-Produktion zu Beginn ab ca. 60 Tagen eine verringerte aber konstante Produktionsrate (Abb. 2).

Diese Phase konstanter Methanproduktion, konstanter CO₂-Akkumulation und stabilen H₂-Partialdrucks sowie konstanter Acetat-Konzentration im Porenwasser wird im Folgenden

dieser Arbeit als der „Steady-State“ bezeichnet. Steady-State-Bedingungen wurden je nach Temperatur nach 60 (37°C) bis 90 Tagen (10°C) erreicht.

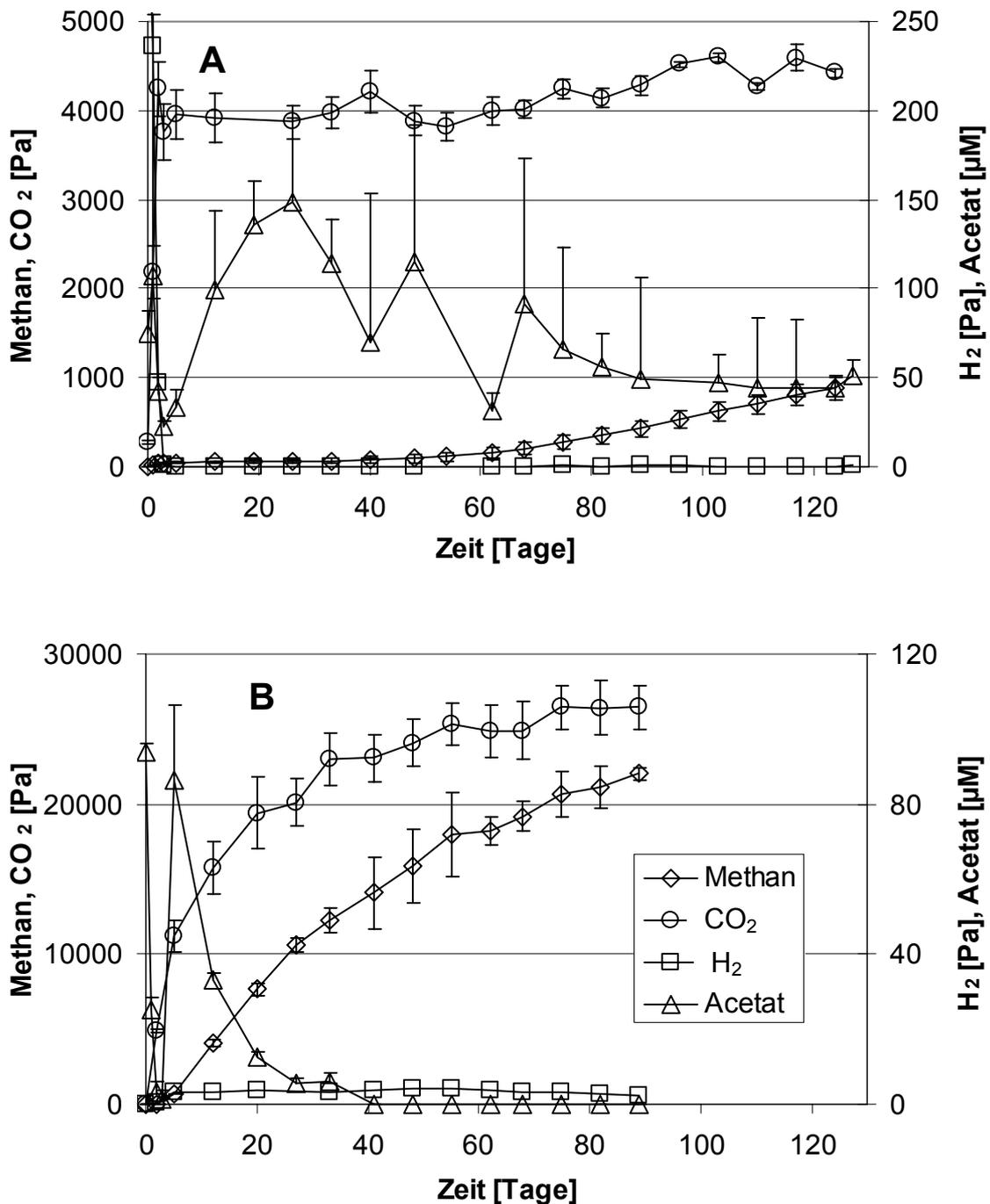


Abb. 2: Produktion von Methan und CO₂, sowie H₂-Partialdruck und Acetat-Konzentration in anaerob inkubierten Bodenaufschlämmungen bei 10°C (A) und 37°C (B). Mittelwerte ± Standardabweichung (n=4).

1.2 **Physiologie und mikrobielle Gemeinschaft unter Steady-State-Bedingungen**

Alle hier dargestellten Ergebnisse wurden unter den in Kapitel 1.1 definierten Steady-State-Bedingungen erzielt. Die Methanproduktion stieg mit der Inkubationstemperatur von 1 nmol g⁻¹ TB h⁻¹ (10°C) bis 9 nmol g⁻¹ TB h⁻¹ (37°C) fast linear an (Anhang A, Abb. 1). Die pH-Werte in den Bodenaufschlammungen nahmen mit ansteigender Temperatur etwas ab und lagen im Bereich pH 7,4 bis 6,9. Der H₂-Partialdruck stieg mit der Temperatur linear von <0,5 Pa (10°C) bis ca. 3,5 Pa (37°C) an (Anhang A, Abb.2). Im Gegensatz dazu waren die Acetat-Konzentrationen zwischen 17 und 37°C konstant bei ca. 5 µM, stiegen aber bei auf unter 17°C sinkenden Temperaturen bis auf ca. 50 µM bei 10°C an (Anhang A, Abb. 2). Dieser Anstieg resultierte in negativeren ΔG-Werten für Acetat-abhängige Methanbildung bei Temperaturen unter 17°C (-27 kJ mol⁻¹ CH₄ bei 10°C) als im Bereich 17-37°C, in dem ΔG mit -15 bis -20 kJ mol⁻¹ CH₄ konstant war (Anhang A, Abb. 3). Im Gegensatz dazu war ΔG für H₂/CO₂-abhängige Methanogenese im gesamten untersuchten Temperaturbereich konstant bei -20 bis -25 kJ mol⁻¹ CH₄. Die verfügbare Energie für homoacetogene Acetat-Bildung aus H₂/CO₂ war bei allen Temperaturen sehr niedrig (ΔG >-7 kJ mol⁻¹ Acetat).

Durch Zugabe von ¹⁴C-markiertem Bicarbonat zu vorinkubierten Proben wurde in zwei Versuchen der Anteil der H₂/CO₂-abhängigen Methanbildung an der Methanogenese bestimmt. Bei 30 und 37°C wurde der theoretisch erwartete Anteil von etwa 1/3 bestätigt (Anhang A, Abb. 4). Abnehmende Inkubationstemperatur resultierte jedoch in einem verringerten Anteil von H₂/CO₂ an der Methan-Bildung von nur 10 bis 15% bei 10°C. Dies bedeutet, dass bei 10°C 85 bis 90% des Methan aus Acetat gebildet werden.

Um einen Einblick in die beteiligte mikrobielle Gemeinschaft der *Archaea* zu bekommen, wurden DNA-fingerprints angefertigt. Ein typisches T-RFLP-Pattern der aus der Gesamt-DNA amplifizierten 16S rRNA-Gene der *Archaea* bei 10°C ist im Anhang A dargestellt (Abb. 5). Die markierten Fragmente (T-RFs) entsprechen den phylogenetischen Linien, die durch Klonen und Sequenzieren charakterisiert wurden (Chin *et al.*, 1999a, Lueders und Friedrich, 2000). Die relative Häufigkeit der einzelnen T-RFs wurde über die relative Peak-Fläche aus allen Peaks >1% der Gesamtfläche berechnet. Dies resultierte in den in Abb. 6 (Anhang A) dargestellten relativen Abundanzen. Einige der T-RFs sind typisch für mehr als eine phylogenetische Linie. So sind die T-RFs von *Methanosarcinaceae* und *Methanomicrobiaceae* auch charakteristisch für einige Mitglieder von Rice Cluster VI.

Genauso kann das T-RF für *Methanosaetaceae* Rice Cluster IV und V enthalten (Chin *et al.*, 1999a, Lueders und Friedrich, 2000). Es zeigte sich, dass die für Rice Cluster I und *Methanosaetaceae* charakteristischen T-RFs in Reisfeldboden dominant sind. Die Abundanzen von Rice Cluster I und *Methanosarcinaceae* nahmen mit steigender Temperatur ab, während *Methanosaetaceae* mit zunehmender Temperatur dominanter wurden. Andere T-RFs mit geringerer Abundanz waren charakteristisch für *Methanobacteriaceae*, Rice Cluster III und Rice Cluster IV. Fragmente, die keiner phylogenetischen Linie zugeordnet werden konnten, wurden als „Diverse“ zusammengefasst. Fragmente mit einer Länge von 810 Basenpaaren oder größer wurden als unverdaute DNA angesehen.

1.3 $\delta^{13}\text{C}$ -Messung

Das $\delta^{13}\text{C}$ des organischen Materials des verwendeten Bodens lag vor der Inkubation bei $-26 \pm 0,3\text{‰}$. Das $\delta^{13}\text{C}$ des gebildeten Methan stieg mit zunehmender Temperatur von etwa -75‰ (10°C) auf -55‰ (37°C ; Abb. 3) an. Zwischen 15 und 37°C war dieser Anstieg linear, zwischen 10° und 15°C war jedoch ein Sprung zu beobachten. Das $\delta^{13}\text{C}$ des CO_2 war weniger negativ (-30‰ bis -15‰), zeigte aber dieselbe Tendenz. Dies resultierte in einem mittleren α -Wert von $1,044$ ($1,041$ bis $1,048$; Abb. 4). Das $\delta^{13}\text{C}$ des Acetat im Porenwasser war im Gegensatz zu Methan und CO_2 konstant zwischen -25‰ bis -30‰ für den Bereich 37 bis 15°C . Zwischen 10 und 15°C kam es jedoch zu einem Sprung zu positiveren Werten, also zu schwererem Acetat. Die resultierenden α -Werte nahmen mit der Temperatur von $1,059$ (10°C) auf $1,029$ (37°C) ab (Mittel: $1,038$), wobei die Änderung wieder zwischen 10 und 15°C am deutlichsten war. Bei den α -Werten ist zu beachten, dass diese nur im es sich nur um Annäherungen handelt. Die wahren α -Werte stellen sich nur im isotopischen Steady-State ein, der im Experiment normalerweise nicht erreicht wird (Whiticar, 1999).

Mit Hilfe des durch Zugabe von ^{14}C -Bicarbonat ermittelten $f_{\text{H}_2/\text{CO}_2}$, dem Anteil der hydrogenotrophen Methanbildung an der Gesamtmethanbildung, und unter Annahme konstanter Fraktionierungsfaktoren α für die Methanbildung aus Acetat bzw. CO_2 wurde versucht, das $\delta^{13}\text{C}$ des gebildeten Methans nachzubilden (Berechnungen durchgeführt von Thomas Marik, MPI für Chemie, Mainz; Tab. 9). Die für die Berechnung benutzten α -

Werte wurden in Reinkulturen von *Methanosarcina barkeri* ($\alpha_{\text{Acetat}}=1,02-1,03$; Krzycki *et al.*, 1987) bzw. in anoxischem Sediment ermittelt ($\alpha_{\text{CO}_2}=1,062$; Blair *et al.*, 1993). Im Temperaturbereich 15 bis 30°C zeigte sich eine sehr gute Übereinstimmung der berechneten $\delta^{13}\text{C}$ -Werte mit den gemessenen Werten. Bei 37°C ergaben sich etwas zu negative, bei 10°C jedoch mit einer Abweichung von ca. 31% vom Messwert viel zu positive Werte. Weiter wurde unter Annahme eines konstanten Fraktionierungsfaktors $\alpha=1,028$ für die Methanbildung aus Acetat aus den gemessenen Isotopen $\delta^{13}\text{C}$ -Werte für aus CO_2 gebildetem Methan und daraus Fraktionierungsfaktoren α_{CO_2} berechnet (Tab. 9). Zwischen 15 und 30°C zeigte sich eine relativ konstante Fraktionierung des CO_2 . Bei 37°C war die Fraktionierung etwas geringer, bei 10°C ergab sich jedoch eine sehr starke Fraktionierung von $\alpha_{\text{CO}_2}=1,31$. Die Fraktionierungsfaktoren α_{CO_2} lagen in der gleichen Größenordnung wie die nach Blair *et al.* (1993) berechneten α_{CO_2} -Werte (Tab. 9). Es konnte jedoch kein so deutlicher Anstieg der Fraktionierung mit abnehmender Inkubationstemperatur beobachtet werden.

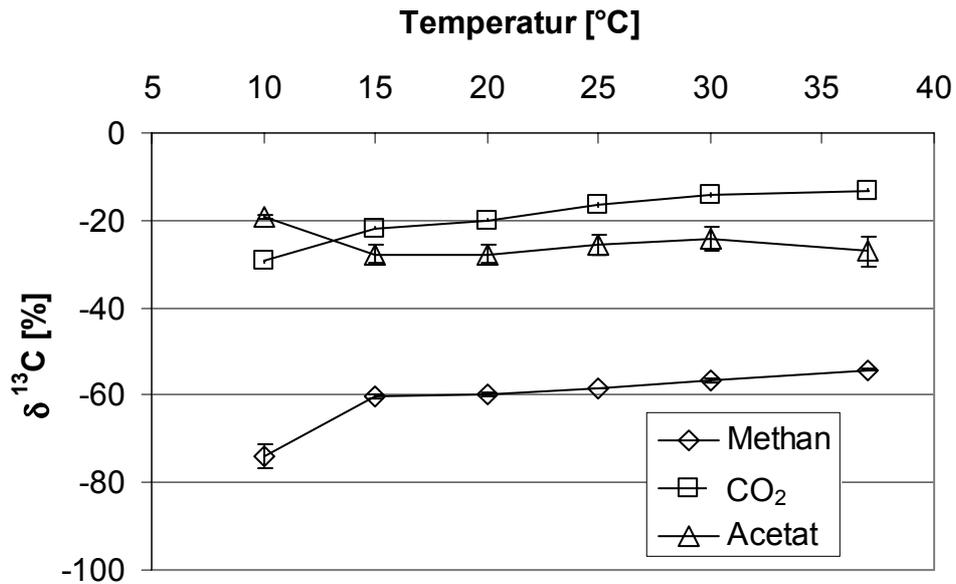


Abb. 3: $\delta^{13}\text{C}$ -Isotopenverhältnis von Methan, CO_2 in der Gasphase und Acetat im Porenwasser anaerob inkubierter Bodenaufschlammungen unter Steady-State-Bedingungen. Mittelwerte \pm Standardabweichung (n=5 bzw. 3 (Acetat)).

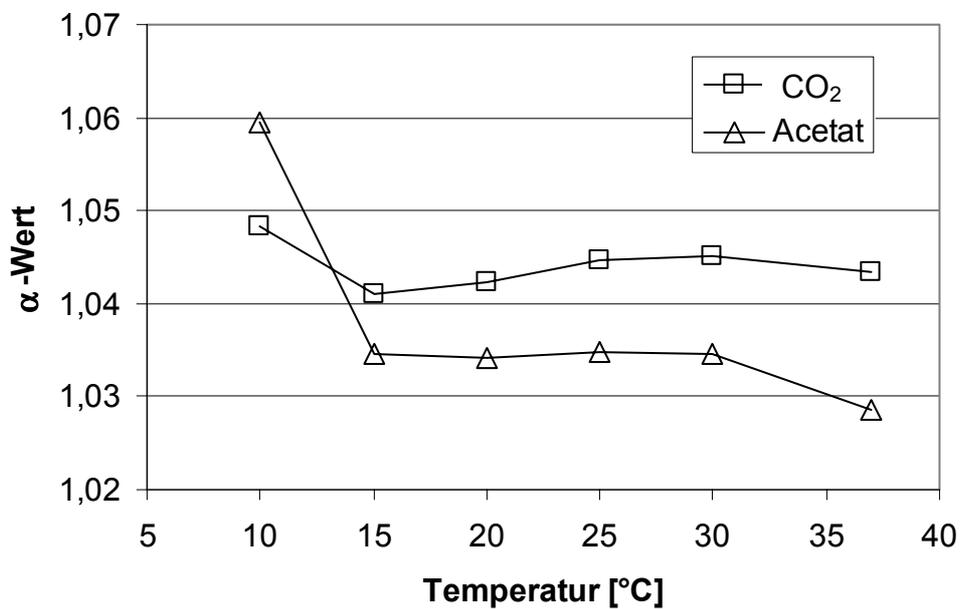


Abb. 4: Aus den $\delta^{13}\text{C}$ -Werten berechnete α -Werte für Methan-Bildung aus CO_2 bzw. Acetat.

Tab. 9: Berechnung der theoretischen Isotopie des gebildeten CH₄ unter Annahme konstanter Fraktionierungsfaktoren α_{CO_2} und α_{Acetat} aus den gemessenen Isotopien von CO₂ und Acetat sowie Berechnung des Fraktionierungsfaktors α_{CO_2} für die CH₄-Bildung aus CO₂ aus allen gemessenen Isotopien und unter Annahme eines konstanten Fraktionierungsfaktors α_{Acetat} für die CH₄-Bildung aus Acetat, sowie die nach Blair *et al.* (1993) berechneten α_{CO_2} -Werte.

Temperatur (°C)	$f_{\text{H}_2/\text{CO}_2}$ (%) ¹⁾	$\delta^{13}\text{CH}_4$	$\delta^{13}\text{CO}_2$	$\delta^{13}\text{C-}$ Acetat	α_{Acetat} ²⁾	$\delta^{13}\text{CH}_4$ (Acetat)	α_{CO_2} ²⁾	$\delta^{13}\text{CH}_4$ (CO ₂)	$\delta^{13}\text{CH}_4$ (berechnet)	$\delta^{13}\text{CH}_4$ ³⁾ (CO ₂)	α_{CO_2} (berechnet)	α_{CO_2} ⁴⁾ (berechnet)
10	13,3	-74,1	-29,4	-19,1	1,028	-45,8	1,062	-86,1	-51,2	-258,5	1,309	1,061
15	26,2	-60,4	-21,9	-27,8	1,028	-54,2	1,062	-79,0	-60,7	-77,6	1,060	1,060
20	24,8	-59,8	-19,9	-27,8	1,028	-54,2	1,062	-77,1	-59,9	-76,6	1,061	1,058
25	28,4	-58,5	-16,3	-25,6	1,028	-52,1	1,062	-73,8	-58,3	-74,4	1,063	1,057
30	32,1	-56,7	-14,2	-24,1	1,028	-50,7	1,062	-71,8	-57,4	-69,5	1,059	1,055
37	35,0	-54,2	-13,1	-27,1	1,028	-53,6	1,062	-70,8	-59,6	-55,3	1,045	1,054

¹⁾ $f_{\text{H}_2/\text{CO}_2}$ wurde durch Zugabe von ¹⁴C-Bicarbonat bestimmt.

²⁾ Annahme konstanter Fraktionierungsfaktoren bei der Methanbildung aus Acetat bzw. CO₂. Die Fraktionierungsfaktoren wurden so kalibriert, dass eine möglichst gute Annäherung der berechneten $\delta^{13}\text{CH}_4$ an die gemessenen $\delta^{13}\text{CH}_4$ -Werte erhalten wurde.

³⁾ Berechnung der Isotopie der Methanbildung aus CO₂ unter der Annahme eines konstanten α_{Acetat} von 1,028 und Berechnung des nötigen α_{CO_2} um die gemessene Isotopie des Methan zu erhalten.

⁴⁾ Temperaturabhängigkeit des α_{CO_2} nach Blair *et al.* (1993): $\ln \alpha_{\text{CO}_2} = 23/T - 0,022$.

1.4 Zellzahl der H₂/CO₂-abhängigen Methanogenen

Aus den Methan-Produktionsraten aus dem Thermoblockversuch sowie dem $f_{\text{H}_2/\text{CO}_2}$ wurde über die „maintenance energy“ die Zahl der H₂/CO₂-verwertenden Methanogenen abgeschätzt (Abb. 5). Diese Daten geben nur potentielle Zellzahlen an, da sie unter der Annahme eines Gleichgewichtszustandes ohne Wachstum berechnet wurden. Bei gegebener CH₄-Produktion aus H₂/CO₂ und den thermodynamischen Randbedingungen (H₂-Konzentration) kann die CH₄-Bildungsrate gerade den Erhaltungsstoffwechsel der errechneten Zellzahl befriedigen. Es zeigte sich, dass die Zahl der hydrogenotrophen Methanogenen mit der Temperatur von $8,3 \times 10^4$ (10°C) auf $2,0 \times 10^5$ (25 und 30°C) zunahm und bei 37°C wieder auf $1,5 \times 10^5$ Zellen g⁻¹ TB abnahm (Abb. 5). Um die Güte dieser Schätzung zu testen, wurden MPN-Bestimmungen bei 10, 25 und 37°C durchgeführt. Diese Bestimmung ergab mit $2,2 \times 10^5$ bzw. $1,4 \times 10^5$ Zellen g⁻¹ TB bei 25 bzw. 37°C fast exakt die theoretisch erwartete Zellzahl. Bei 10°C war die MPN mit $1,2 \times 10^3$ um fast zwei Größenordnungen geringer als erwartet.

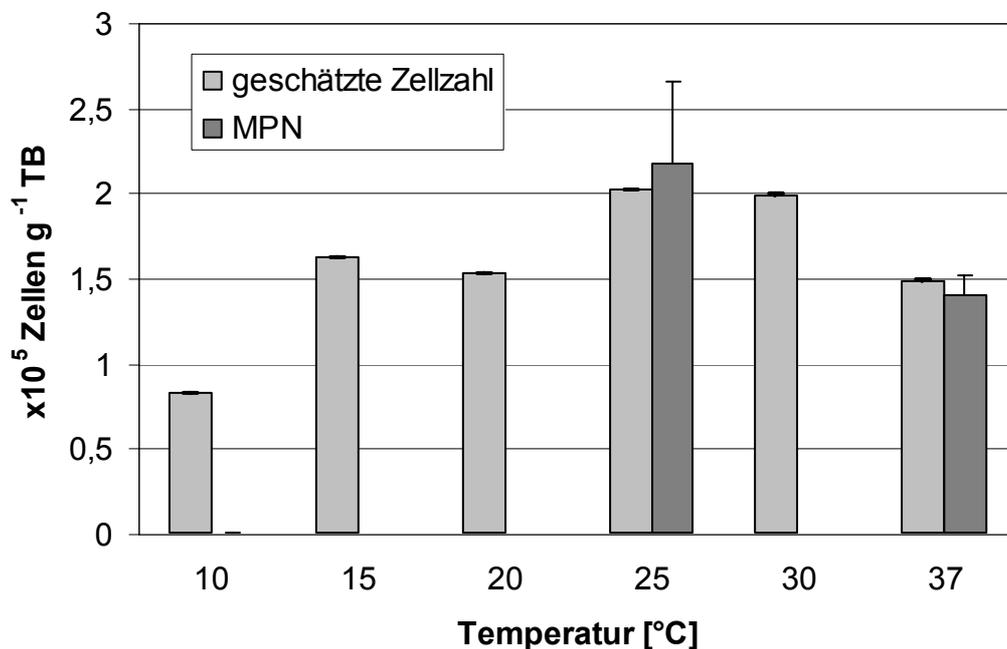


Abb. 5: Aus der „maintenance energy“ berechnete potentielle Zellzahl hydrogenotropher Methanogener in anaerob inkubierten Bodenaufschlämmungen unter Steady-State-Bedingungen sowie Bestimmung der MPN bei 3 Temperaturen. Mittelwerte + Standardfehler.

2 Neue thermophile Methanogene in Reisfeldboden

Die vorliegenden Ergebnisse sind zum größten Teil in dem zur Veröffentlichung eingereichten Manuskript „Thermophilic methanogens in rice field soil“ (siehe Anhang B) enthalten und werden hier nur kurz dargestellt.

2.1 Methanproduktion und methanogene Substrate

Da bei dem in Kapitel 1 beschriebenen Thermoblockversuch das Temperaturoptimum der Methanbildung in Reisfeldboden noch nicht erreicht war, wurde der Versuch bis zu einer Obergrenze von 80°C fortgesetzt. Wie in Kapitel 1 beschrieben, begann die Methanproduktion nach 2 Tagen Vorinkubation, worauf die Proben im Thermoblock auf die verschiedenen Temperaturen verteilt wurden. Nach insgesamt 12 Tagen Inkubation zeigte sich ein klares Temperaturoptimum bei 41-42°C (Anhang B, Abb. 1). Höhere Temperaturen resultierten in einem deutlichen Rückgang der Methanbildung. Nach 33 Tagen änderte sich das Bild völlig: Ein zweites Temperaturoptimum zeigte sich bei etwa 50°C (Anhang B, Abb. 1), was auf das Vorhandensein thermophiler Methanogener hindeutet. Dieses zweite Temperaturoptimum begann sich nach 20 Tagen Inkubation zu entwickeln (nicht dargestellt). Zwischen diesen beiden Temperaturoptima bei 41°C und 50°C war die Methanproduktion auch nach 33 Tagen noch sehr gering, stieg aber innerhalb von 89 Tagen Inkubation an (Anhang B, Abb. 1). Bei Temperaturen $\geq 60^\circ\text{C}$ konnte keine Methanproduktion beobachtet werden. Die CO₂-Bildung setzte sich im Gegensatz zur Methan-Bildung bis etwa 74°C fort. Bei 80°C konnte jedoch keinerlei CO₂-Bildung mehr festgestellt werden (Daten nicht dargestellt).

Nach 89 Tagen Inkubation hatten die Konzentrationen der methanogenen Substrate H₂ und Acetat konstante Werte erreicht, was auf einen Steady-State hinweist (Kapitel 1; Yao und Conrad, 1999a, 2000b). Der H₂-Partialdruck stieg unter Steady-State-Bedingungen (Mittelwert der letzten 5 Messungen) mit der Temperatur von ca. 0,5 Pa bei 10°C auf 5,5 Pa bei 50°C an (Anhang B, Abb. 2). Beim Überschreiten des zweiten Temperaturoptimums kam es jedoch zu einem starken Anstieg auf bis zu 350 Pa bei ca. 70°C und einem starken Rückgang bei noch höheren Temperaturen. Bei 80°C wurde kein H₂ mehr produziert. Die Acetat-Konzentrationen im Porenwasser waren bis zum ersten Temperaturoptimum (41°C) sehr gering ($< 10 \mu\text{M}$; Anhang B, Abb. 3). Bei höheren Temperaturen kam es aber zu

einem Anstieg der Acetat-Konzentration auf ca. 200 μM . Beim Überschreiten des zweiten Temperaturoptimums ($> 55^\circ\text{C}$) akkumulierte Acetat bis zu 25 mM. Gleichzeitig kam es auch zu einer Akkumulation von Propionat auf bis zu 4 mM, das bei niedrigeren Temperaturen nicht nachweisbar war ($<5 \mu\text{M}$). Bei mehr als 75°C wurden beide Intermediate nicht mehr produziert.

Um zu zeigen, dass die geringe Methan-Produktion zwischen den beiden Temperaturoptima auf die geringe Zahl der Methanogenen zurückzuführen war und nicht auf eine Substratlimitierung aufgrund geringer Aktivität der fermentierender Bakterien, wurden Bodenaufschlammungen bei 37 und 50°C unter einer Gasphase aus H_2/CO_2 inkubiert. Dabei zeigte sich eine deutlich längere lag-Phase der Methanbildung (7 gegenüber 2 Tage) bei 50 gegenüber 37°C . Bei 50°C resultierten die aktuellen Konzentrationen von Substraten und Produkten unter Steady-State Bedingungen in ΔG -Werten für hydrogenotrophe und acetoklastische Methan-Bildung von $-15 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ CH}_4$ bzw. $-27 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ CH}_4$. Die Zugabe von ^{14}C -markiertem Bicarbonat ergab einen Anteil von $105 \pm 13,6\%$ Methan produziert aus H_2/CO_2 . Die Wiederfindung des ^{14}C lag bei 85% .

2.2 Mikrobielle Gemeinschaft

Um einen Einblick in die Struktur der methanogenen Gemeinschaft der *Archaea* zu bekommen, wurde DNA aus bei 4 Temperaturen zwischen 37 und 50°C inkubierten Bodenaufschlammungen extrahiert (Anhang B, Abb. 1; Temperaturen mit Pfeilen markiert) und T-RFLP-Analysen durchgeführt. Ein typisches T-RFLP-Muster der 16S rRNA-Gene der *Archaea*, amplifiziert aus der Gesamt-DNA von bei 37°C inkubierten Bodenaufschlammungen ist im Anhang B, Abb. 4 dargestellt. Die markierten Fragmente (T-RFs) entsprechen phylogenetischen Linien, die durch Klonieren und Sequenzieren charakterisiert wurden (Chin *et al.*, 1999a; Lueders und Friedrich, 2000). Die relative Häufigkeit der einzelnen T-RFs wurde über die relativen Peakflächen bestimmt, wobei alle Peaks $>1\%$ der Gesamtfläche eingerechnet wurden.

Die T-RFLP-Analyse ergab eine Abundanz von Rice Cluster I von ca. 20% bei 37°C (Anhang B, Abb. 5). Höhere Inkubationstemperaturen resultierten in einer höheren Abundanz von 40% bei 41°C , dem ersten Temperaturoptimum, und 80% bei 45 und 49°C . Die acetoklastischen methanogenen *Methanosaetaceae* und der *Euryarchaeot* Rice Cluster III verschwanden bei Temperaturen oberhalb des ersten Temperaturoptimums (41°C).

Neben Rice Cluster I wurden bei 45 und 49°C nur *Methanosarcinaceae*, der *Crenarchaeot* Rice Cluster IV und mit einer sehr geringen Abundanz (<1%) *Methanobacteriaceae* gefunden.

Die Quantifizierung der verschiedenen *Archaea* kann dadurch fehlerhaft sein, dass einige T-RFs von verschiedenen phylogenetischen Linien stammen können. Beispielsweise sind die T-RFs der *Methanosarcinaceae* auch typisch für Rice Cluster VI (Lueders und Friedrich, 2000). Die übrigen T-RFs sind in italienischem Reisfeldboden sehr spezifisch für bestimmte phylogenetische Linien. Das T-RF des Rice Cluster I wurde nur selten unter Klonen von *Methanobacteriaceae*, Rice Cluster II und IV gefunden (Lueders und Friedrich, 2000).

Aus der DNA bei 49°C inkubierter Bodenaufschlämmungen wurde eine Klonbibliothek der 16S rDNA der *Archaea* erstellt. 11 Klone wurden zufällig ausgewählt und sequenziert. 10 dieser 11 Klone fielen in Rice Cluster I und nur ein Klon gehörte zu Rice Cluster IV (Anhang B, Abb. 6). Dies bestätigte das Ergebnis der T-RFLP-Analyse, die eine Dominanz von Rice Cluster I bei 49°C zeigte.

3 Einfluss der Temperatur auf methanogene Abbauprozesse – Suche nach dem limitierenden Schritt

Nach den vorhergehenden Versuchen zur Physiologie der Methanogenese blieb noch eine wichtige Frage zu klären: Sind die beobachteten Effekte wirklich eine direkte Folge des Temperatureinflusses auf die Methanogenen oder liegt die Limitierung bereits in einem der vorhergehenden Schritte des methanogenen Abbaus (Hydrolyse von Polymeren, Fermentation). Um Antworten auf diese Frage zu bekommen, wurden die Raten des Initialschritts (Hydrolyse von Polymeren) und des terminalen Schritts (Methanogenese) des anaeroben Abbaus gemessen. Dies wurde sowohl für die potentielle Aktivität (unter Substratsättigung, um eine Substratlimitierung auszuschließen) als auch für die aktuelle Aktivität (Einsatz von geringen Mengen markierten Substrats, um eine Stimulierung durch hohe Substratverfügbarkeit auszuschließen) mit verschiedenen Substraten durchgeführt.

Die Versuche wurden, wie auch in Kapitel 1, unter physiologischen Bedingungen (bei 10 bis 37°C) durchgeführt. Hierzu wurden 60-90 Tage in Serumflaschen bei 10, 15, 20, 25, 30 und 37°C vorinkubierte Bodenaufschlammungen verwendet.

3.1 Potentielle Hydrolyserate

Zur Ermittlung der Rate des Initialschritts des anaeroben Abbaus wurde ein Enzymtest mit fluoreszenzmarkierten Substraten durchgeführt. Bestimmt wurden die Aktivitäten der Exo- β -D-Glucanase und der β -D-Glucosidase, zwei der Enzyme die am Zelluloseabbau beteiligt sind. Die Glucosidase-Aktivität war bei allen Temperaturen um ein mehrfaches höher als die Glucanase-Aktivität (Abb. 6). Sie stieg von 104 nmol g⁻¹ TS h⁻¹ (10°C) auf 176 nmol g⁻¹ TS h⁻¹ (37°C). Die Glucanase-Aktivität hingegen lag im Bereich 11 nmol g⁻¹ TS h⁻¹ (10°C) bis 75 nmol g⁻¹ TS h⁻¹ (37°C). Die Steigung der Glucanase-Aktivität war größer als die der Glucosidase-Aktivität, was auf eine größere Temperaturempfindlichkeit hindeutet. Um eine unspezifische Reaktion der Glucosidase zu verhindern, wurde die Glucanase-Aktivität unter Zusatz des Hemmstoffs Gluconolacton (GLN) bestimmt. Diese war bei 10°C fast gleich wie die Aktivität ohne Hemmstoff, der Unterschied nahm aber mit zunehmender Temperatur zu. Die Aktivierungsenergien betragen 16 kJ mol⁻¹ (MUF_{Glu}), 49 kJ mol⁻¹ (MUF_{Cel}) und 38 kJ mol⁻¹ (MUF_{Cel+GLN}).

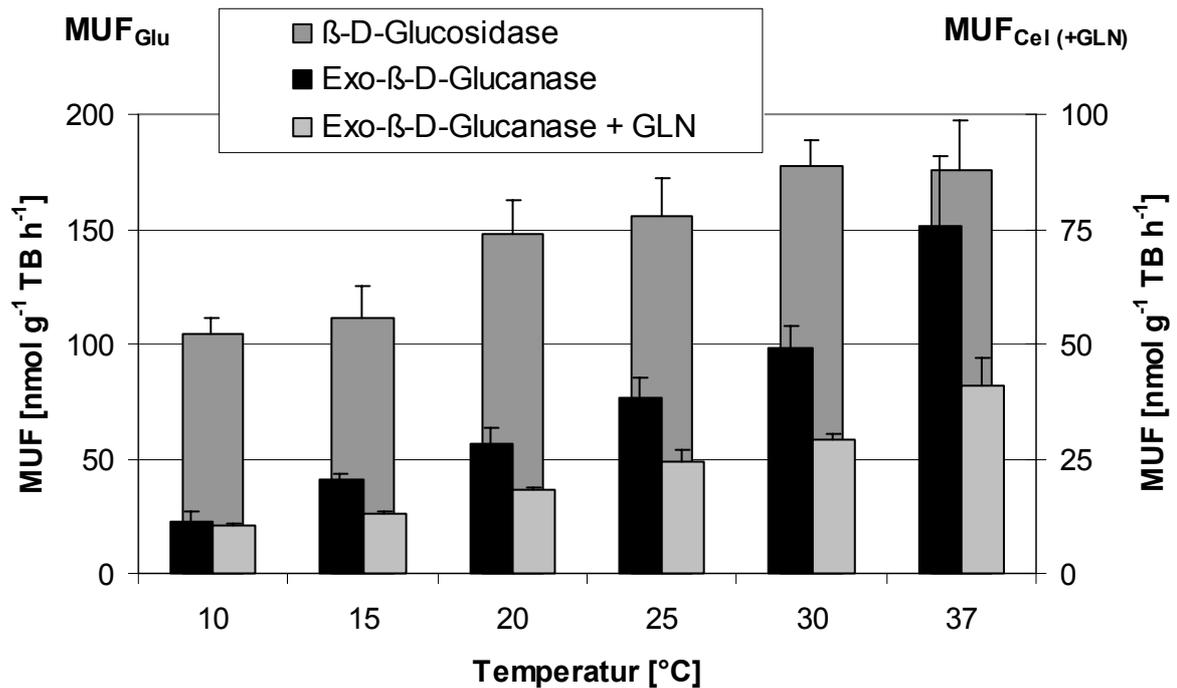


Abb. 6: β-D-Glucosidase- und Exo-β-D-Glucanase-Aktivität unter Steady-State-Bedingungen und Substratsättigung. GLN: Gluconolacton, ein Hemmstoff der Glucosidase. Mittelwerte + Standardabweichungen (n=4).

Ergänzend sollte überprüft werden, ob die gemessene Temperaturabhängigkeit durch die Menge extrazellulärer Enzyme oder durch einen Temperatureffekt auf die Aktivität der vorhandenen Enzyme zurückzuführen ist. Dazu wurden Proben bei 10 und 37°C bis zum Erreichen des Steady-State vorinkubiert (60 bzw. 90 Tage). In diesen Proben wurde die Glucosidase-Aktivität bestimmt, wobei der Enzymtest jeweils bei 10, 25 und 37°C durchgeführt wurde. Es zeigte sich, dass die bei 10°C vorinkubierten Proben bei allen Temperaturen eine etwas höhere Aktivität aufwiesen (Abb. 7), wobei die höchste Aktivität bei 25°C festzustellen war. Offensichtlich wird bei niedrigen Temperaturen eine größere Menge extrazellulärer Enzyme freigesetzt, um den Effekt einer Temperaturlimitierung auf die Enzymaktivität auszugleichen.

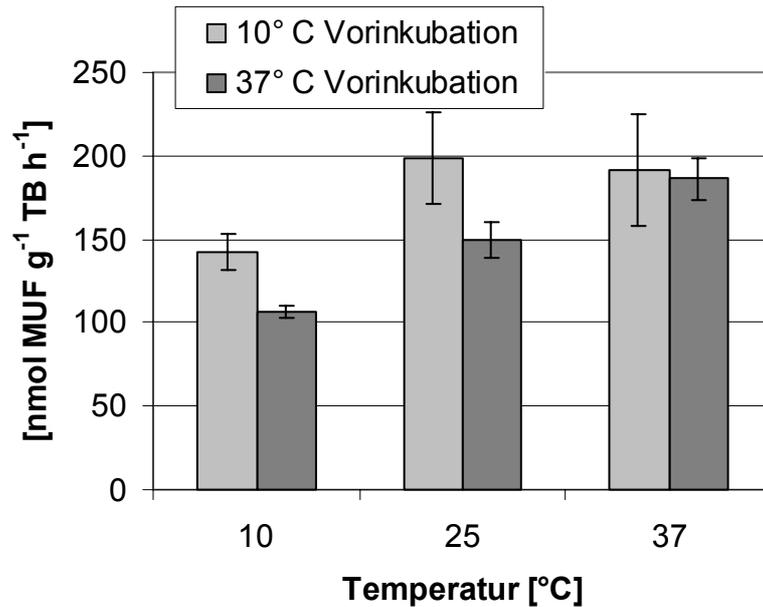


Abb. 7: β -D-Glucosidase-Aktivität unter Steady-State-Bedingungen bei Durchführung des Enzymtests unter 3 Temperaturen nach Vorinkubation bei 10 und 37°C. Mittelwerte \pm Standardabweichungen (n=4).

3.2 Aktuelle Hydrolyserate

Neben der Rate der potentiellen Hydrolyse wurde auch die Rate der aktuellen Hydrolyse, also die bei aktueller Substratkonzentration tatsächliche Rate, bestimmt. Nach Hemmung der Monosaccharid-Aufnahme in die Zelle konnte eine Akkumulation von Glucose beobachtet werden. Andere Zucker waren nicht nachweisbar (Nachweisgrenze 10 μ M). Aus der Glucose-Akkumulation über die Zeit wurde die Glucose-Freisetzungsrates, die hier als die aktuelle Aktivität der hydrolytischen Enzyme angesehen wird, berechnet ($r^2 = 0,92 \pm 0,05$). In Abb. 8 ist diese Rate im Vergleich zur potentiellen Glucanase-Aktivität (+GLN) dargestellt. Die aktuelle Rate war mit 4,0 nmol g⁻¹ TB h⁻¹ (10°C) bis 12,1 nmol g⁻¹ TB h⁻¹ (37°C) geringer als die potentielle Aktivität und wies nur eine sehr geringe Temperaturabhängigkeit auf, die in einer Aktivierungsenergie von 29 kJ mol⁻¹ resultierte.

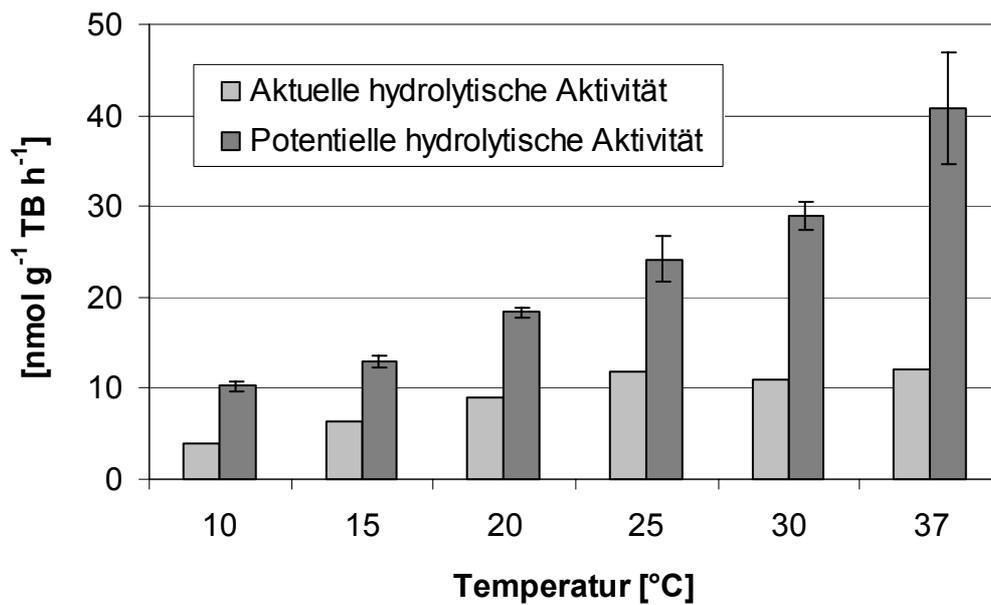


Abb. 8: Vergleich der aktuellen Hydrolyserate (berechnet aus der Glucose-Akkumulation nach Hemmung mit Toluol) mit der Rate der potentiellen Glucanase-Aktivität (+GLN) unter Steady-State-Bedingungen. Mittelwerte \pm Standardabweichungen (n=4).

3.3 Potentielle Methanbildung aus verschiedenen Substraten

Um Aufschluss darüber zu bekommen, ob die Methanbildung bei den verschiedenen Temperaturen eher temperaturlimitiert oder substratlimitiert ist, wurde die Methanogenese mit mehreren Substraten stimuliert. Die verwendeten Substrate Glucose, Propionat, Acetat und H₂ können entweder direkt von den Methanogenen verwertet werden oder werden zunächst von Fermentierern in die methanogenen Substrate umgesetzt (Zehnder, 1978). Gleichzeitig sollte der Versuch Aufschluss über die Intermediate beim Glucose-Abbau und der H₂-Produktion ergeben.

In Vorversuchen wurden die jeweiligen Substrat-Konzentrationen ermittelt, die zur stärksten Stimulation der Methan-Bildung führten. Diese Konzentrationen wurden in Bodenaufschlammungen, anaerob inkubiert in Serumflaschen, nach Austausch der Gasphase durch N₂ eingestellt. Die Proben wurden bei den entsprechenden Temperaturen weiterinkubiert. Im Verlauf von maximal 22 Tagen wurden die Intermediate und Produkte regelmäßig gemessen.

3.3.1 Intermediate und Produkte nach Stimulation mit verschiedenen Substraten

Um Aufschluss über beteiligte Intermediate und damit die beteiligten Abbauwege verschiedener organischer Verbindungen zu bekommen, wurden die Substrate, gebildete organische Säuren und H_2 nach der Substratzugabe gemessen. Der Verlauf dieser Intermediate soll hier beispielhaft für die zwei Temperaturextreme des Versuchs, 10 und 37°C dargestellt werden.

3.3.1.1 Kontrollversuch

Die Methan-Bildung der Kontrolle war sowohl bei 10°C (Abb. 9 A) als auch bei 37°C (Abb. 9 B) über den gesamten Messzeitraum linear. Der CO_2 -Partialdruck war schon zu Beginn der Inkubation relativ hoch, der Anstieg nahm aber rasch ab. H_2 -Partialdrücke nahmen zu Versuchsbeginn etwas zu, gingen dann aber zurück auf generell sehr geringe Partialdrücke. Acetat hingegen wurde bei 10°C mit relativ hoher Konzentration von bis zu 1140 μM gefunden, die sich im Verlauf des Experiments kaum änderte (Abb. 9 A). Bei allen anderen Temperaturen war die Acetat-Konzentration sehr gering (Abb. 9 B). Bei 10°C wurden maximal 171 μM Propionat gefunden. Die Konzentration nahm mit der Temperatur ab. Bei Temperaturen >20°C war Propionat nicht mehr nachweisbar.

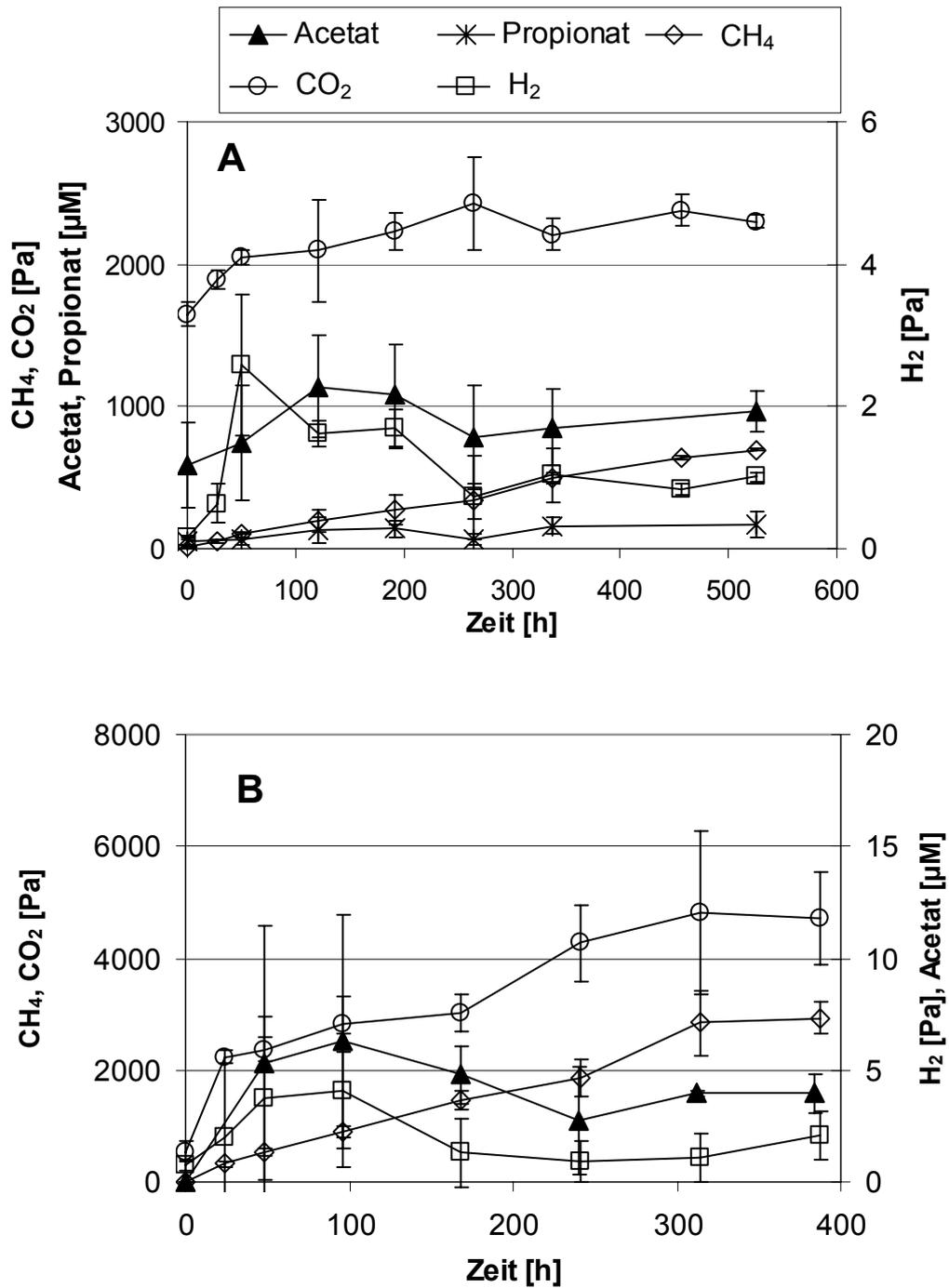


Abb. 9: Kontrolle des Substratversuchs (ohne Substrat-Zugabe) bei 10°C (A) und 37°C (B). Mittelwerte \pm Standardabweichungen (n=3).

3.3.1.2 Glucose-Verwertung

Glucose wurde bei 10°C innerhalb von 6 Tagen aufgenommen (Abb. 10 B). Dabei wurden Acetat, Butyrat und in geringerem Maße Formiat, Propionat und Lactat gebildet (Abb. 10 B). Methan wurde sofort nach der Glucose-Zugabe mit über den gesamten Versuchszeitraum fast konstanter Rate gebildet (Abb. 10 A). Die intensive CO₂-Bildung stoppte, nachdem die Glucose umgesetzt war. Gleichzeitig mit dem Umsatz der Glucose kam es zu einer Akkumulation von H₂ und Formiat, die beide im weiteren Verlauf des Experiments wieder verbraucht wurden.

Bei 37°C war die zugegebene Glucose schon innerhalb von 24 Stunden vollständig verwertet (Abb. 11 B). Dabei akkumulierten Acetat und Butyrat, deren Konzentration aber wieder abnahm. Formiat und Propionat spielten hier nur eine geringe Rolle. Auch bei 37°C kam es mit dem Umsatz der Glucose zu einer kurzzeitigen Akkumulation von H₂ (Abb. 11 A). Mit dem Verschwinden der Glucose verringerte sich auch die CO₂-Akkumulation. Nach dem Verbrauch des H₂ und der verringerten CO₂-Akkumulation nahm die Acetat-Konzentration ab und die Methan-Bildung ging in eine 2. Phase mit deutlich höherer Rate über. Dieser Effekt konnte bei allen Temperaturen >10°C beobachtet werden. Die Methan-Bildung nach Glucose-Zugabe wird deshalb im Folgenden in Phase I und Phase II unterteilt.

Die Intermediate und Produkte des Glucose-Umsatzes wurden in mol C umgerechnet. Bezogen auf die jeweilige Wiederfindung wurden daraus nach Abzug der Kontrolle die relativen Anteile der einzelnen Verbindungen zu jedem Zeitpunkt berechnet (Tab. 10). Die wichtigsten Verbindungen – bezogen auf ihren relativen Anteil am Glucose-Abbau – waren CO₂ (inklusive gelöstem Bicarbonat), Acetat und Butyrat. Iso-Butyrat, Iso-Valerat, Valerat und Caproat wurden nur bei 10°C nachgewiesen. Die Mittelwerte wurden aus Phase II der Methan-Produktion nach Glucose-Zugabe berechnet, in der auch die stärkste Akkumulation von Intermediaten zu beobachten war. In Abb. 12 sind diese gemittelten Anteile der Intermediate bei den verschiedenen Temperaturen dargestellt. Es zeigte sich, dass Acetat immer einen Anteil von 18-35% an der C-Wiederfindung hatte. Butyrat war mit 35-41% beteiligt, CO₂ mit 20-30% und Methan mit ca. 10%. Die Summe aus Acetat und Butyrat zeigte mit zunehmender Temperatur eine leicht abnehmende Tendenz von 66% bei 10°C auf 53-58% bei 30 bzw. 37°C.

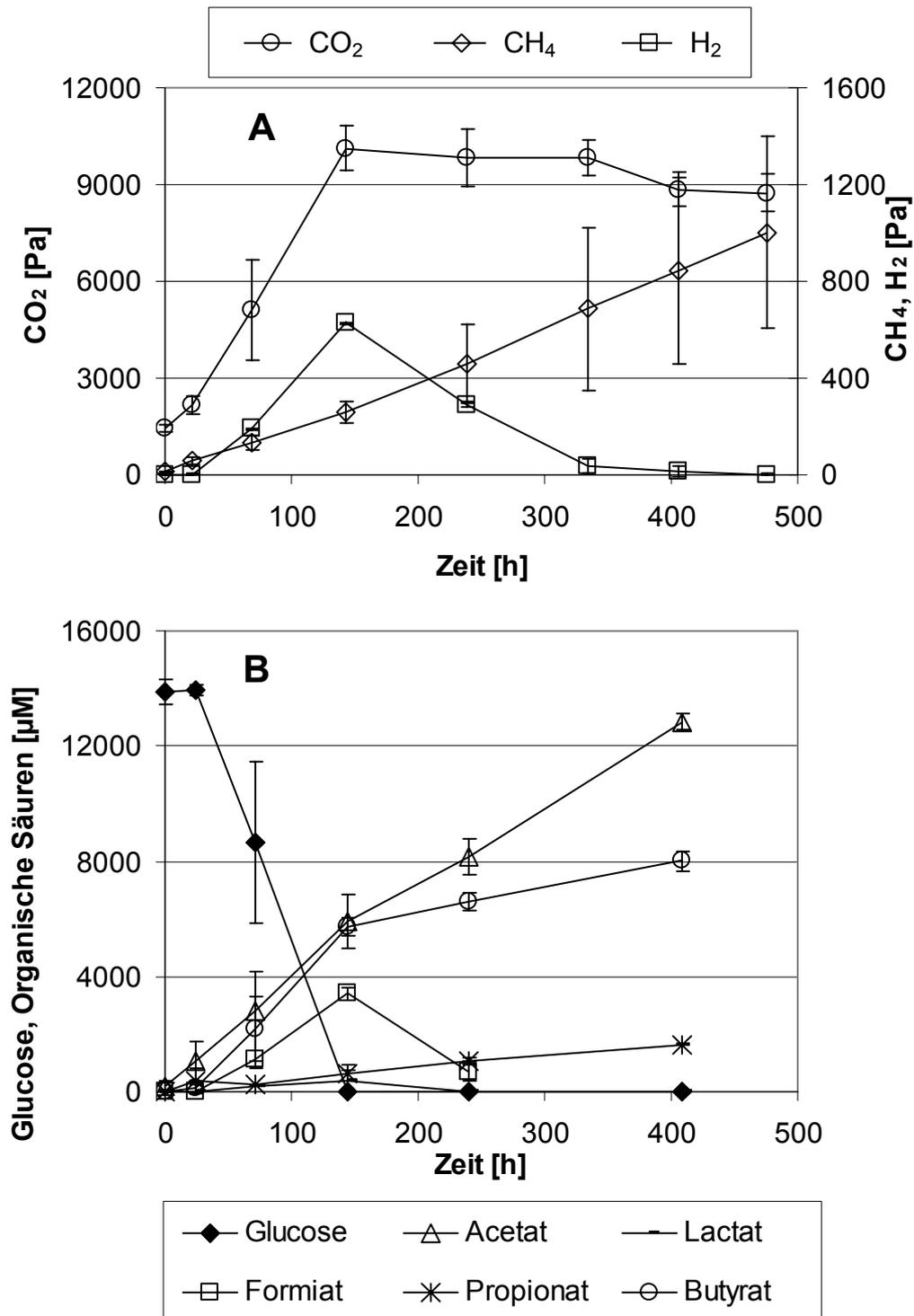


Abb. 10: Verwertung von Glucose (B) in anaerob inkubiertem Reisfeldboden unter Steady-State-Bedingungen bei 10°C und die dabei gebildeten organischen Säuren (B) sowie Methan, CO_2 und H_2 (A). Mittelwerte \pm Standardabweichungen ($n=5$ bzw. 3 bei Gasmessungen bzw. Messungen im Porenwasser).

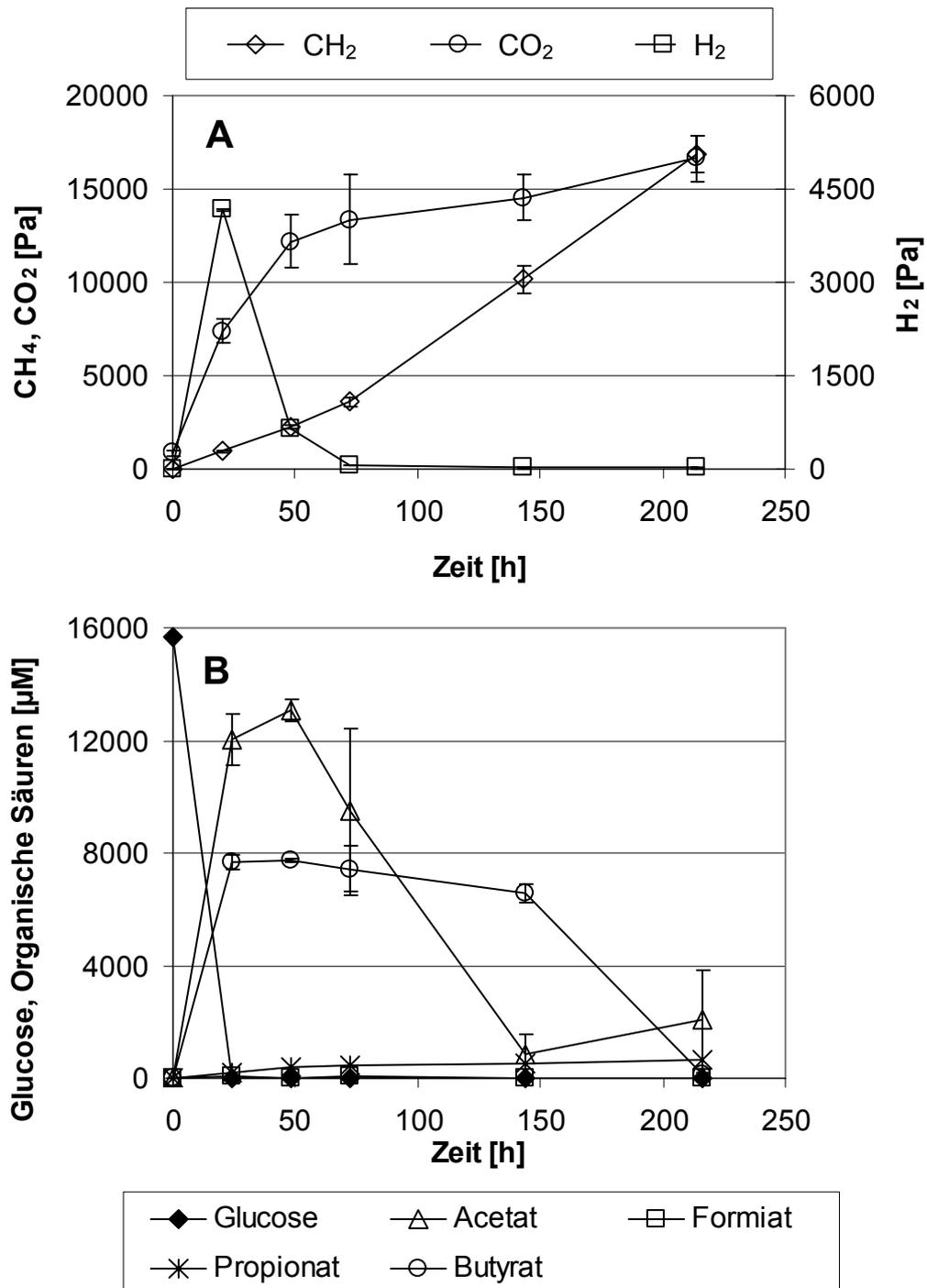


Abb. 11: Verwertung von Glucose (B) in anaerob inkubiertem Reisfeldboden unter Steady-State-Bedingungen bei 37°C und die dabei gebildeten organischen Säuren (B) sowie Methan, CO₂ und H₂ (A). Mittelwerte ± Standardabweichungen (n=5 bzw. 3 bei Gasmessungen bzw. Messungen im Porenwasser).

Tab. 10: Anteile der einzelnen Intermediate und Produkte des Glucose-Abbaus in anaerob inkubiertem Reisfeldboden im Verlauf des Experiments bei 10 bis 37°C. Alle Daten wurden in mol C umgerechnet. CO₂ beinhaltet auch das gelöste Σ CO₂. Die Angaben in % wurden auf die C-Wiederfindung des jeweiligen Messtermins nach Abzug der Kontrolle bezogen. Kursiv dargestellte Werte wurden nicht zur Ermittlung der Mittelwerte herangezogen.

10°C

Zeit (h)	0	22	68	144	239	406	Mittel	Stabw
Glucose	100,0	100,2	62,5	0,0	0,0	0,0		
Methan	0,0	0,0	-0,1	-0,2	-0,2	0,3	0,0	0,3
CO ₂	0,4	0,1	8,2	20,5	20,7	15,0	18,7	3,3
Acetat	0,4	2,6	6,7	14,2	19,5	30,8	21,5	8,5
Lactat	0,0	0,0	0,7	1,4	0,0	0,0	0,5	0,8
Formiat	0,0	0,0	1,3	4,1	0,8	0,0	1,6	2,2
Propionat	0,1	1,4	0,8	2,3	3,9	5,9	4,0	1,8
Butyrat	0,0	0,5	10,5	27,5	31,6	38,4	32,5	5,5
Iso-Butyrat	0,0	0,0	0,0	0,5	0,4	2,4	1,1	1,1
Iso-Valerat	0,0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1
Valerat	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,1	0,1
Caproat	0,0	0,5	0,4	0,3	0,4	0,2	0,3	0,1
Wiederfindung	100,9	105,3	91,2	70,8	77,3	93,3	80,5	11,6

15°C

Zeit (h)	0	27	74	149	241	411	Mittel	Stabw
Glucose	100,0	74,9	0,0	0,0	0,0	0,0		
Methan	0,0	0,7	1,5	-0,6	6,8	14,3	10,6	5,3
CO ₂	-1,3	3,3	14,9	9,8	16,8	18,9	17,9	1,5
Acetat	0,0	3,0	17,8	26,0	23,3	17,5	20,4	4,1
Lactat	0,0	0,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Formiat	0,0	2,6	3,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Propionat	0,0	0,2	1,1	2,0	2,3	2,8	2,5	0,4
Butyrat	0,0	5,9	33,1	34,7	33,1	32,9	33,0	0,1
Wiederfindung	98,7	91,1	71,4	71,9	82,3	86,5	84,4	2,9

20°C

Zeit (h)	0	26	51	98	172	340	Mittel	Stabw
Glucose	100,0	13,2	0,0	0,0	0,0	0,0		
Methan	0,0	0,6	0,8	2,1	3,6	13,8	11,1	7,3
CO ₂	0,0	9,8	11,5	15,8	16,9	24,2	18,9	5,2
Acetat	0,0	10,1	24,4	27,4	23,7	7,8	20,3	11,3
Lactat	0,0	1,5	0,7	0,4	0,0	0,0	0,0	0,0
Formiat	0,0	6,8	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,0
Propionat	0,1	0,4	0,9	2,0	2,3	3,2	3,5	0,6
Butyrat	0,0	19,6	30,3	30,7	30,7	28,8	38,1	1,3
Wiederfindung	100,1	61,9	68,6	78,5	77,2	77,8	77,5	0,4

Fortsetzung Tab. 10:

25°C								
Zeit (h)	0	24	48	97	175	266	Mittel	Stabw
Glucose	100,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0		
Methan	0,0	1,3	2,8	6,1	18,0	36,2	9,0	8,0
CO2	-3,0	14,2	12,7	11,4	21,2	20,8	15,1	5,3
Acetat	0,0	16,1	34,2	30,9	16,1	2,6	27,1	9,6
Lactat	0,0	0,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Formiat	0,0	6,3	0,1	0,1	0,0	0,0	0,1	0,0
Propionat	0,0	0,5	1,4	2,1	2,4	3,0	2,0	0,6
Butyrat	0,0	24,7	28,7	28,5	26,9	14,9	28,0	1,0
Wiederfindung	97,1	63,5	79,9	79,2	84,8	77,6	81,3	3,1
30°C								
Zeit (h)	0	26	51	119	167	290	Mittel	Stabw
Glucose	100,0	0,1	0,1	0,0	0,1	0,3		
Methan	0,0	1,1	2,5	10,8	21,5	37,0	11,6	9,5
CO2	0,4	25,4	26,4	33,4	37,9	26,6	32,5	5,8
Acetat	0,0	31,5	33,7	16,6	2,4	0,0	17,6	15,7
Lactat	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Formiat	0,0	0,1	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Propionat	0,0	0,9	1,5	2,3	2,7	2,4	2,2	0,6
Butyrat	0,0	39,9	39,4	39,6	26,4	0,0	35,1	7,6
Wiederfindung	100,4	98,8	103,6	102,8	91,0	66,4	99,1	7,1
37°C								
Zeit (h)	0	21	48	72	143	214	Mittel	Stabw
Glucose	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0		
Methan	0,0	1,2	3,1	5,2	16,2	27,8	8,2	7,0
CO2	0,2	11,6	20,2	24,0	29,0	33,5	24,4	4,4
Acetat	0,0	25,6	27,8	20,1	1,8	4,4	16,6	13,4
Lactat	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Formiat	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Propionat	0,1	0,6	1,3	1,5	1,7	2,0	1,5	0,2
Butyrat	0,0	32,5	33,0	31,7	27,9	0,5	30,9	2,6
Wiederfindung	100,3	71,6	85,5	82,6	76,6	68,3	81,6	4,5

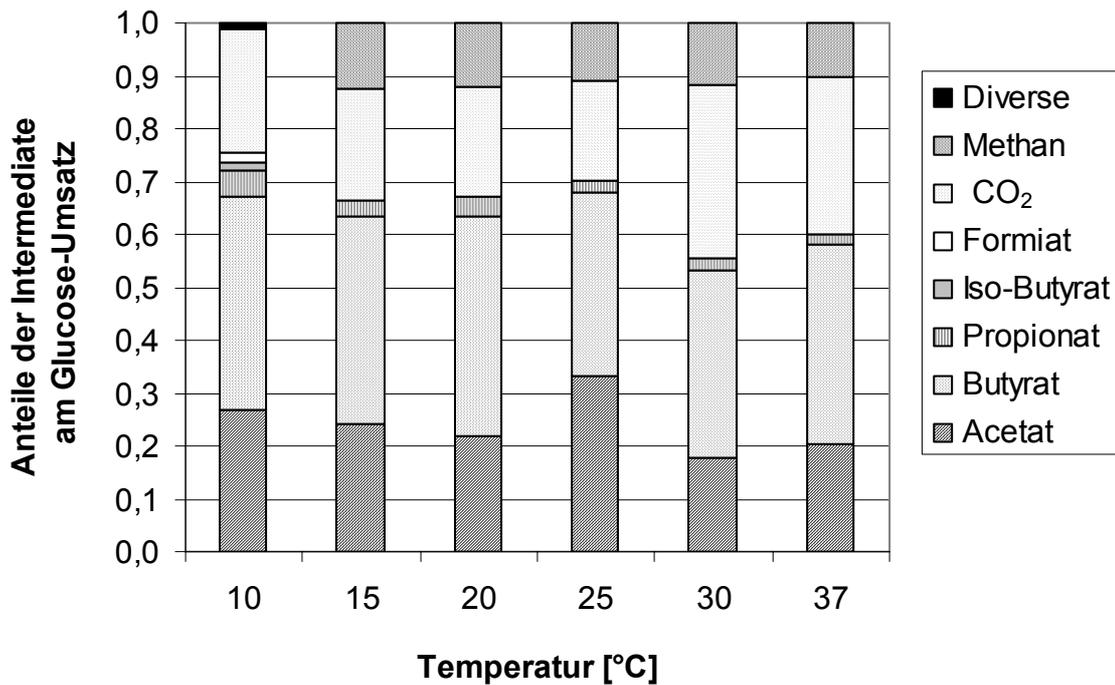


Abb. 12: Anteile der verschiedenen Intermediate am Glucose-Abbau in anaerob inkubiertem Reisfeldboden bei 10-37°C. Die Anteile sind die Mittelwerte aus Tab. 10, bezogen auf mol C relativ zur Gesamtmenge an wiedergefundenen Intermediaten nach Abzug der Konzentrationen im Kontrollversuch. „Diverse“ fasst alle Verbindungen zusammen, die einen Anteil <1% hatten.

3.3.1.3 Propionat-Zugabe

Das zugegebene Propionat wurde bei 10°C (Abb. 13 A) nicht und bei 37°C (Abb. 13 B) nur sehr langsam verwertet. Bei allen Temperaturen kam es zu einer linearen Methanbildung, die nur bei 37°C zurückging, nachdem das Propionat vollständig abgebaut war. CO₂ akkumulierte zu Beginn der Inkubation wie in der Kontrolle (Abb. 9) sehr stark, erreichte aber sehr schnell einen stabilen Partialdruck. Auf den H₂-Partialdruck hatte Propionat keinen Einfluss. Acetat akkumulierte nur bei 37°C deutlich gegenüber der Kontrolle (Abb. 9), verschwand aber nach Verbrauch des Propionats wieder.

Nach Umrechnung der Intermediate und Produkte in mol C wird ersichtlich, dass innerhalb des Inkubationszeitraums mit maximal 28% des Propionat-C nur ein geringer Anteil zu Methan umgesetzt wurde (Tab. 11). Der größte Teil des Propionats wurde zu CO₂ umgesetzt. Allerdings war die Wiederfindung aufgrund der intensiven CO₂-Bildung im

Vergleich zur relativ geringen Propionat-Zugabe viel zu hoch, so dass diese Zusammensetzung aus Methan und CO_2 nur einen groben Anhaltspunkt geben kann.

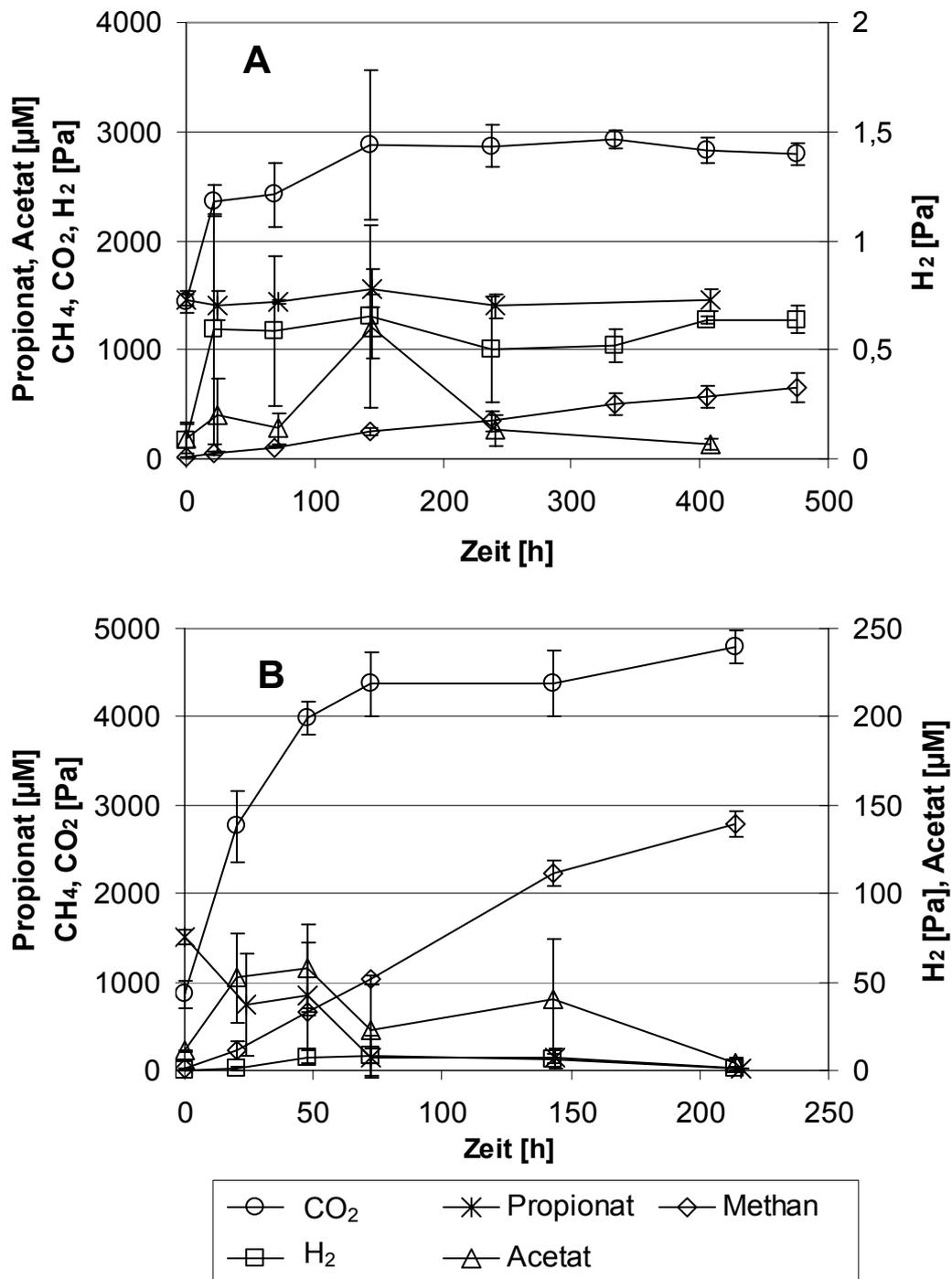


Abb. 13: Verwertung von Propionat in anaerob inkubiertem Reisfeldboden unter Steady-State-Bedingungen bei 10°C (A) und 37°C (B) und das gebildetete Methan, CO_2 , H_2 und Acetat. Mittelwerte \pm Standardabweichungen (n=5 bzw. 3 bei Gasmessungen bzw. Messungen im Porenwasser).

Tab. 11: Gemittelte Anteile der einzelnen Intermediate und Produkte des Propionat-Abbaus in anaerob inkubiertem Reisfeldboden im Verlauf des Experiments bei 10 bis 37°C. Alle Daten wurden in mol C umgerechnet. CO₂ beinhaltet auch das gelöste ΣCO₂. Angaben in %, bezogen auf die Gesamtmenge des in Intermediaten wiedergefundenen C nach Abzug der Kontrolle.

Temperatur [°C]	10	15	20	25	30	37
CH₄	0 ± 0	25 ± 5	28 ± 15	13 ± 2	12 ± 2	20 ± 3
CO₂	48 ± 38	68 ± 8	66 ± 12	84 ± 1	87 ± 1	79 ± 2
Acetat	52 ± 38	7 ± 2	6 ± 3	2 ± 1	1 ± 1	1 ± 1
Wiederfindung [%]	154 ± 26	116 ± 0	106 ± 3	151 ± 12	255 ± 10	201 ± 4

3.3.1.4 Acetat-Zugabe

Das zugegebene Acetat wurde bei 10°C (Abb. 14 A) fast nicht, bei 37°C (Abb. 14 B) hingegen innerhalb von ca. 170 h vollständig verwertet. Daraus resultierte bei 10°C eine Methanbildung, die linear verlief und etwa die gleiche Größenordnung aufwies wie die Kontrolle (Abb. 9 A). Bei 37°C kam es zu einer gegenüber der Kontrolle erhöhten linearen Methanbildung, die nach dem vollständigen Abbau des Acetats auf das Niveau der Kontrolle zurückging. CO₂ verhielt sich wie in der Kontrolle, bei 37°C wurde jedoch mehr CO₂ gebildet. Während das Acetat verwertet wurde, kam es bei 37°C zu einer geringen Erhöhung des H₂-Partialdrucks auf maximal 7 Pa, der nach dem Verschwinden des Acetats wieder auf die ursprüngliche Größenordnung von 1-2 Pa zurückging. Gleichzeitig kam es auch zu einer geringfügigen transienten Propionat-Akkumulation. Bei 10°C akkumulierte Propionat aufgrund des langsamen Acetat-Abbaus sehr langsam, aber stetig.

Die Umrechnung der gebildeten Intermediate und Produkte in mol C zeigt, dass Acetat im jeweils zur Hälfte zu Methan und CO₂ umgesetzt wurde und nur 1-7% C in Propionat übergingen (Tab. 12). Dies entspricht ca. 50% reduktivem Umsatz zu Methan.

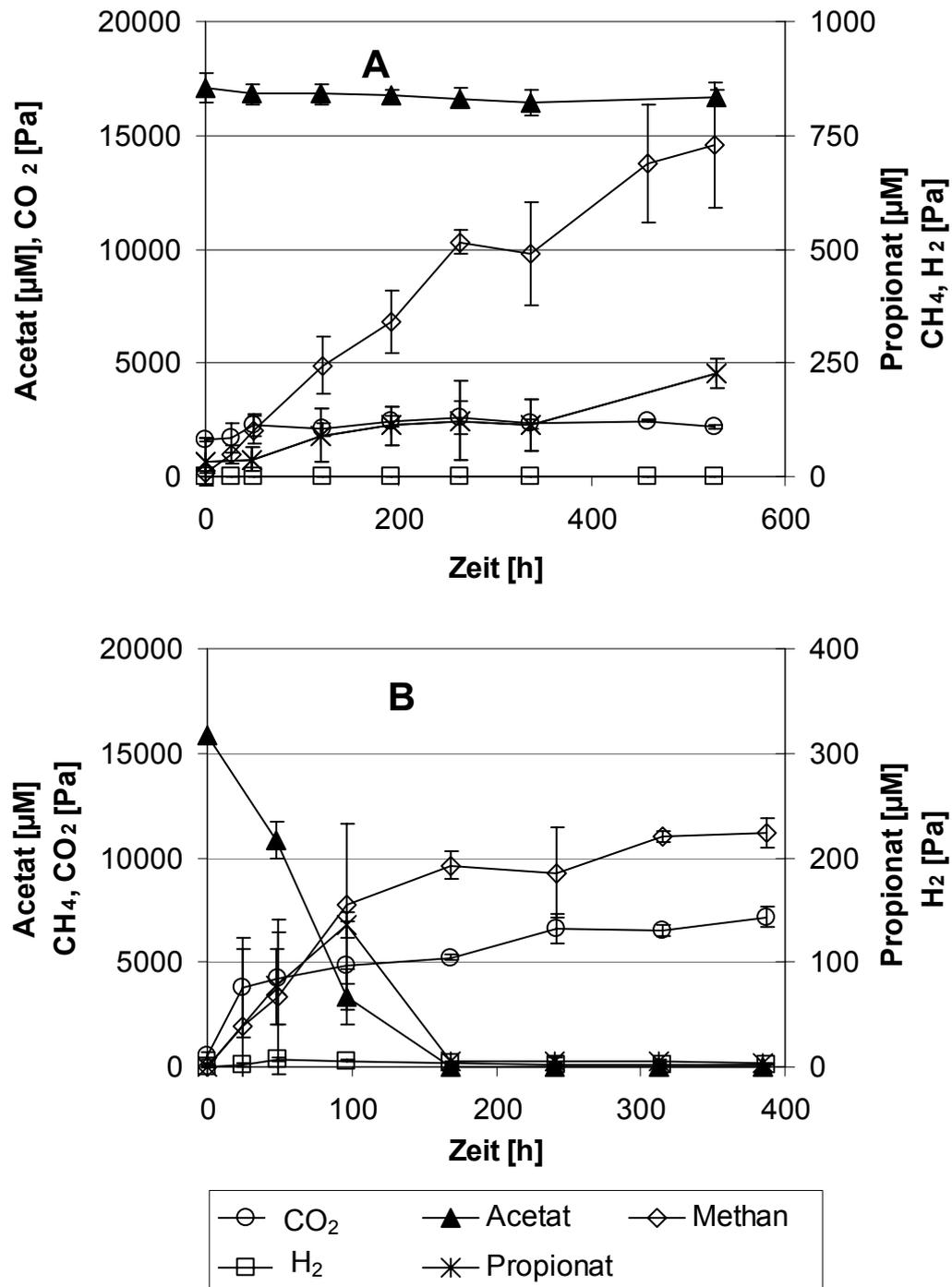


Abb. 14: Verwertung von Acetat in anaerob inkubiertem Reisfeldboden unter Steady-State-Bedingungen bei 10°C (A) und 37°C (B) und das gebildete CH_4 , CO_2 , H_2 und Propionat. Mittelwerte \pm Standardabweichungen (n=5 bzw. 3 bei Gasmessungen bzw. Messungen im Porenwasser).

Tab. 12: Gemittelte Anteile der Intermediate und Produkte des Acetat-Umsatzes in anaerob inkubiertem Reisfeldboden im Verlauf des Experiments bei 10 bis 37°C. Alle Daten wurden in mol C umgerechnet. CO₂ beinhaltet auch das gelöste Σ CO₂. Angaben in %, bezogen auf die Gesamtmenge des in Intermediaten wiedergefundenen C nach Abzug der Kontrolle. Die Berechnung erfolgte in der Phase der linearen Methanbildung direkt nach Inkubationsbeginn. n.b.: nicht bestimmbar.

Temperatur [°C]	10	15	20	25	30	37
CH₄	n.b.	53 ± 10	51 ± 7	52 ± 7	44 ± 2	70 ± 4
CO₂	n.b.	40 ± 11	43 ± 8	46 ± 8	55 ± 4	29 ± 4
Propionat	n.b.	7 ± 3	6 ± 12	2 ± 1	1 ± 1	1 ± 1
Wiederfindung [%]	96 ± 6	87 ± 3	73 ± 12	59 ± 13	56 ± 7	85 ± 5

3.3.1.5 H₂-Zugabe

Bei 10°C wurde der Wasserstoff in der Gasphase nicht verwertet (Abb. 15 A). Der CO₂-Partialdruck blieb konstant und die Methan-Bildung war geringer als in der Kontrolle (Abb. 9 A). Es kam zunächst zu einer kurzfristigen Akkumulation von Formiat, nach deren Rückgang sich Acetat anreicherte (Abb. 15 B). In geringerem Ausmaß reicherten sich auch Propionat, Iso-Butyrat, Iso-Valerat, Valerat und Caproat an.

Der Verlauf bei den Temperaturen 15 bis 30°C war abgesehen von der schnelleren Geschwindigkeit mit zunehmender Temperatur gleich. Deshalb wird hier beispielhaft der Verlauf bei 20°C dargestellt (Abb. 16). Bei 20°C konnte ein teilweiser Verbrauch des Wasserstoff beobachtet werden (Abb. 16 A). Der CO₂-Partialdruck stieg kurzfristig an, das CO₂ wurde dann aber im Zuge der parallel verlaufenden Methan- und Acetat-Bildung verbraucht (Abb. 16 A, B). Damit verschwand dann auch das gleichzeitig mit CO₂ akkumulierte Formiat. Der H₂-Verbrauch und sowohl die Methan-Bildung also auch die Acetat-Akkumulation gingen drastisch zurück.

Bei 37°C konnte ein ähnlicher Verlauf wie bei 15 bis 30°C beobachtet werden (Abb. 17). Allerdings stoppte die Methan-Bildung nicht mit dem Verbrauch des CO₂ (ca. 50 h; Abb. 17 A), wie bei den anderen Temperaturen beobachtet (Abb. 16). Stattdessen wurde das

angehäufte Acetat teilweise zu Methan umgesetzt (Abb. 17 B). Nach ca. 170 h stoppten der Verbrauch des Acetat und gleichzeitig verringerte sich die Methan-Bildung. Im Gegensatz zu den anderen Temperaturen zeigt sich also bei 37°C ein 2-phasiger Verlauf der Methan-Bildung. In der ersten Phase erfolgte die CH₄-Bildung aus H₂/CO₂, in der zweiten aus Acetat.

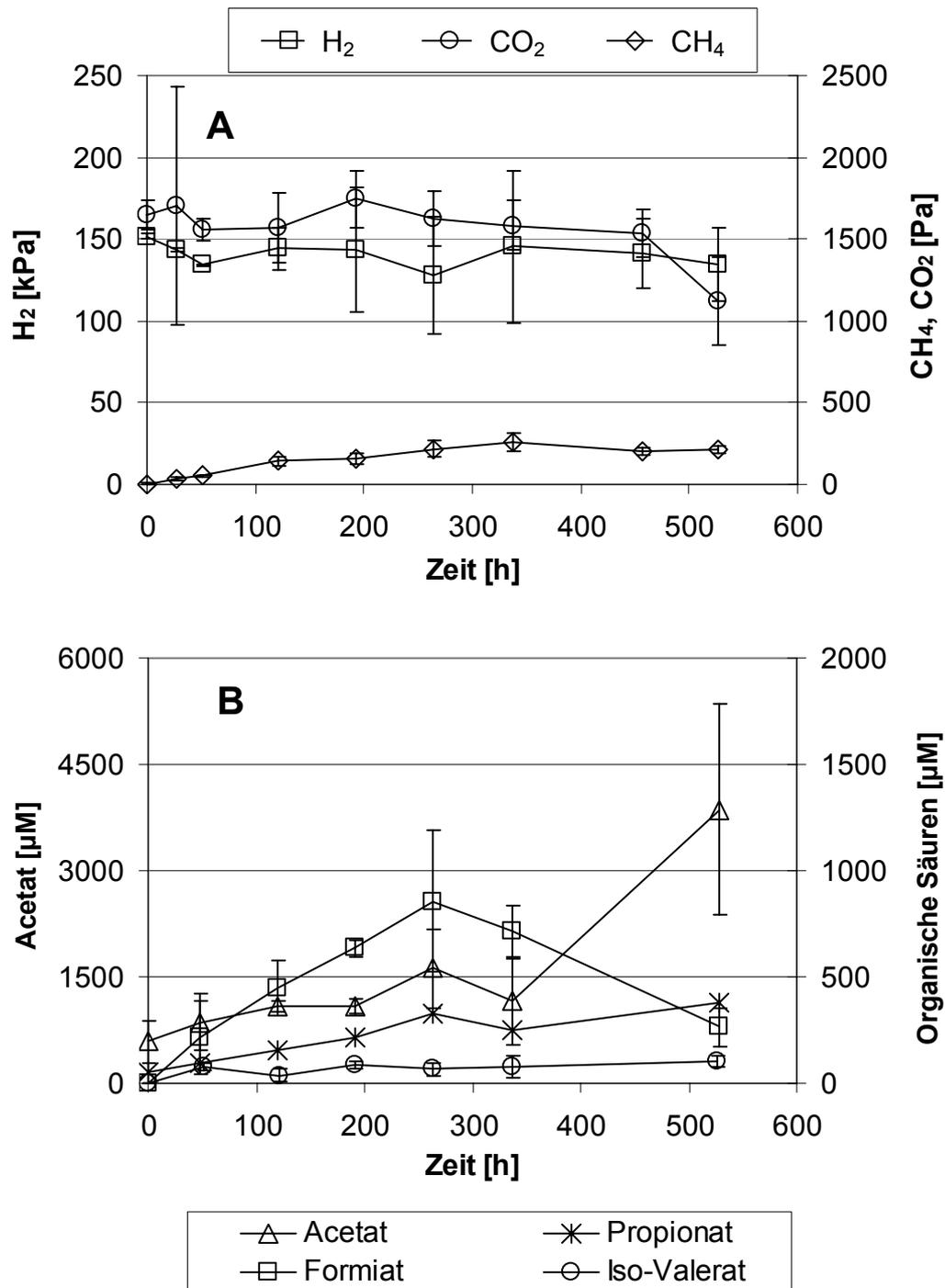


Abb. 15: Verwertung von H₂ in anaerob inkubiertem Reisfeldboden unter Steady-State-Bedingungen bei 10°C (A) und das gebildetete Methan, CO₂ (A) sowie Acetat und andere organische Säuren (B). Mittelwerte \pm Standardabweichungen (n=5 bzw. 3 bei Gasmessungen bzw. Messungen im Porenwasser).

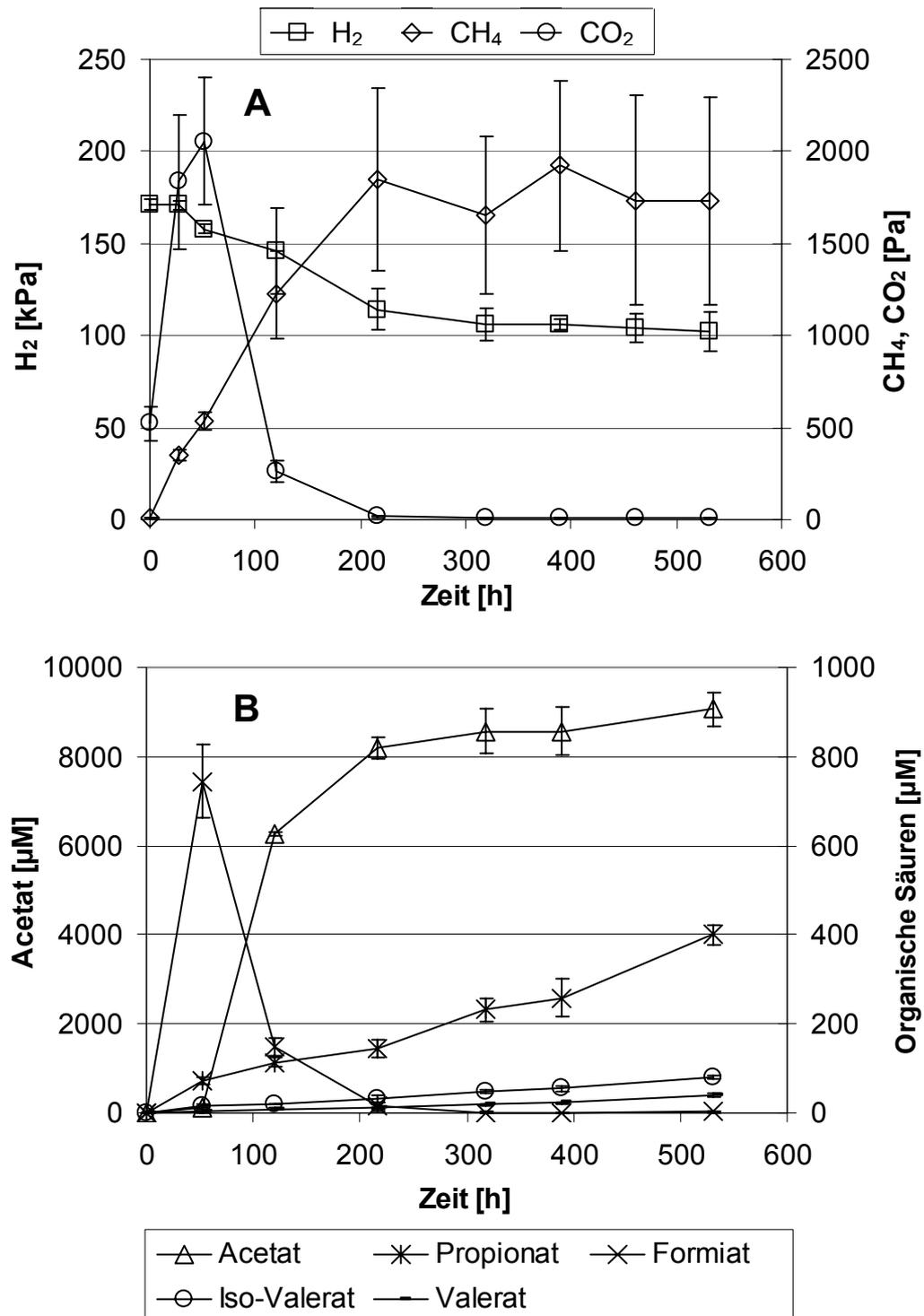


Abb. 16: Verwertung von H₂ in anaerob inkubiertem Reisfeldboden unter Steady-State-Bedingungen bei 20°C (A) und das gebildete Methan, CO₂ (A) sowie Acetat und andere organische Säuren (B). Mittelwerte \pm Standardabweichungen (n=5 bzw. 3 bei Gasmessungen bzw. Messungen im Porenwasser).

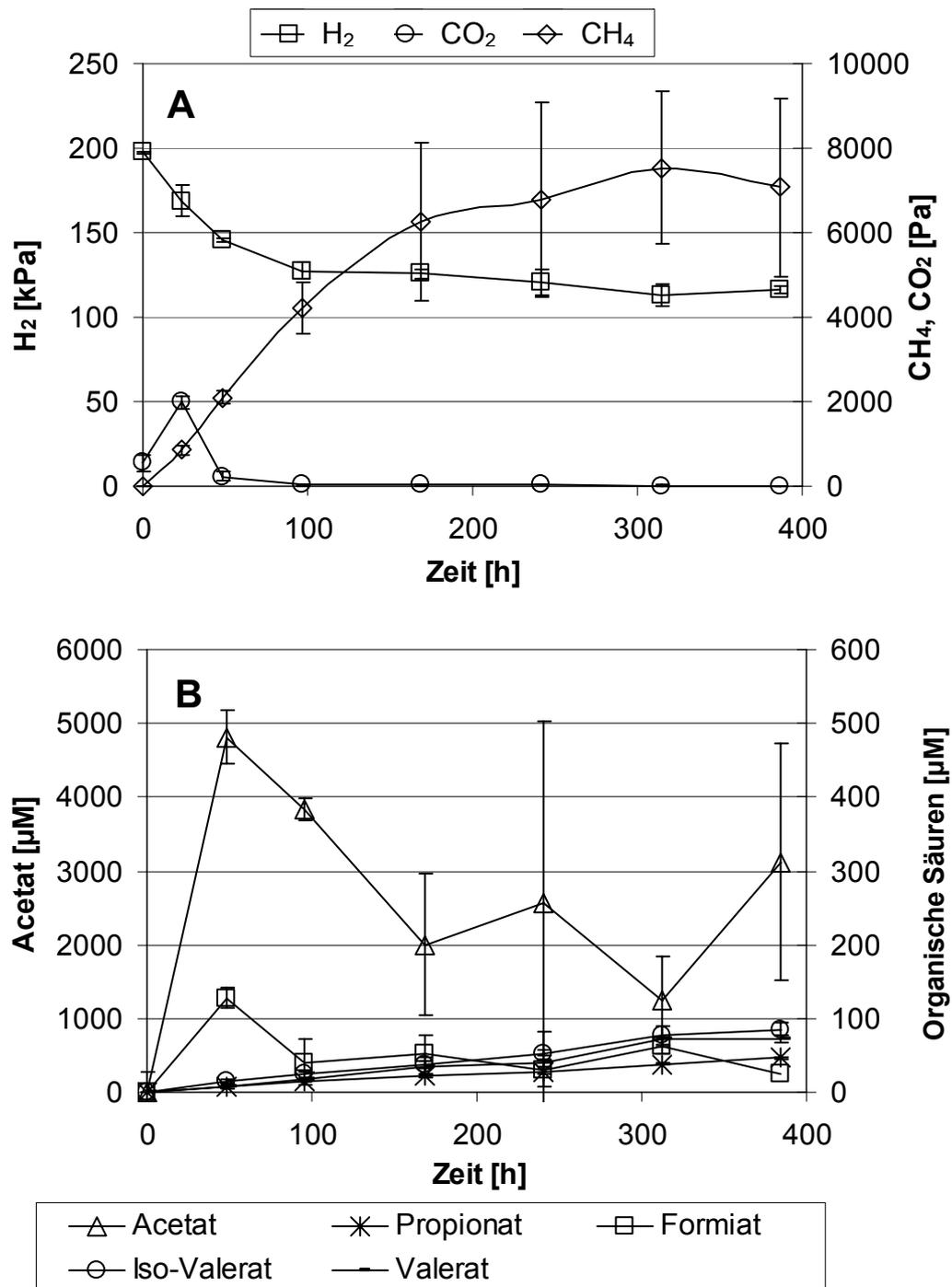


Abb. 17: Verwertung von H₂ in anaerob inkubiertem Reisfeldboden unter Steady-State-Bedingungen bei 37°C (A) und das gebildetete Methan, CO₂ (A) sowie Acetat und andere organische Säuren (B). Mittelwerte \pm Standardabweichungen (n=5 bzw. 3 bei Gasmessungen bzw. Messungen im Porenwasser).

3.3.1.6 Bilanzierung der Substratversuche

Für sämtliche Substratversuche wurde sowohl eine C-Bilanz als auch einen Elektronen-(O/R-) Bilanz berechnet (Tab. 13). Im Acetat- und im Glucose-Versuch wurden im Mittel 86 bzw. 85% des zugegebenen C und 85 bzw. 56% der Elektronen wiedergefunden. Bei den anderen beiden Versuchen waren die Bilanzen deutlich ungünstiger. Beim Versuch mit H₂-Zugabe deuten die H₂-Bilanzen an, dass nur ein geringer Teil des verbrauchten Wasserstoffs wiedergefunden wurde. Die C-Bilanz ergab bei der Berechnung aus CH₄ und CO₂ mit 88% etwas zu niedrige Werte. Wenn zusätzlich die Acetat-Bildung eingerechnet wurde, ergaben sich mit 129% zu hohe Werte. Eine O/R-Bilanz konnte aufgrund der extrem hohen H₂-Konzentration nicht berechnet werden. Nach der Zugabe von Propionat wurden sowohl zu viel Elektronen als auch zu viel C wiedergefunden.

Tab. 13: Bilanzierung der Substratversuche. Es wurde für jeden einzelnen Messpunkt bilanziert. In die Mittelwerte wurden alle Messpunkte im Zeitraum linearer Methan-Bildung eingerechnet. Angegeben sind Mittelwerte (Mittel) und Standardabweichungen (Stabw) in %.

Temperatur [°C]		10		15		20		25		30		37		Mittel Stabw	
		Mittel	Stabw												
H₂	H₂-Bilanz¹⁾	29	15	55	40	42	7	377	342	40	3	36	4	96	138
	C-Bilanz²⁾	101	6	136	36	68	52	63	37	77	57	81	42	88	27
	C-Bilanz³⁾	133	12	139	32	120	24	102	32	130	13	148	27	129	16
Acetat	C-Bilanz	96	3	87	8	79	15	75	20	84	16	95	8	86	9
	O/R-Bilanz	103	10	70	53	76	8	90	27	127	16	43	9	85	29
Glucose	C-Bilanz	90	13	84	11	78	13	81	3	96	14	80	7	85	7
	O/R-Bilanz	61	20	44	15	50	10	42	7	66	8	74	33	56	13
Propionat	C-Bilanz	133	25	145	32	124	28	134	21	240	48	185	37	160	45
	O/R-Bilanz	161	158	81	28	99	3	285	152	667	17	391	60	281	223

¹⁾ Verbrauch des H₂ und Einbau in CH₄ und Acetat bilanziert.

²⁾ Aus CH₄ und CO₂ gegen den C-Fluss des Kontrollversuchs (ohne Substratzugabe) bilanziert.

³⁾ Aus CH₄, CO₂ und Acetat gegen den C-Fluss des Kontrollversuchs (ohne Substratzugabe) bilanziert.

3.3.2 Methan-Produktionsraten

Aus der linearen Methanbildung in den ersten Tagen der Inkubation wurde die Methanproduktionsrate aus den verschiedenen Substraten berechnet (Abb. 18).

Es zeigt sich, dass bei 10°C keines der Substrate zu einer Stimulation der Methan-Bildung im Vergleich zur Kontrolle führte. Bei dieser Temperatur scheint die Methanbildung selbst temperaturlimitiert zu sein. Mit zunehmender Temperatur nahm die Stimulation durch zugegebene Substrate zu. Die stärkste Stimulation wurde mit Glucose erreicht, allerdings erst in Phase II der Methanbildung, gefolgt von Acetat. Aufgrund der Steigung der Methanproduktion mit der Temperatur, scheint die acetoklastische Methanogenese auch am empfindlichsten auf die Temperatur zu reagieren. Auffällig ist, dass es erst bei >20°C zu einer stärkeren Stimulation kam, während der Effekt bei niedrigeren Temperaturen nur sehr gering war. Nahezu gleiche Stimulation wurde durch Zugabe von H₂ und Glucose, Phase I der Methanbildung, erreicht, wobei Glucose schon bei niedrigeren Temperaturen zu etwas höherer Methanproduktion führte. Propionat bewirkte nur eine geringe Stimulation der Methanbildung, was auf eine geringe Bedeutung von Propionat im Reisfeldboden hinweisen könnte.

Als Vergleich wurden die Raten der aktuellen Hydrolyse unter der Annahme, dass aus 1 mol Glucose 3 mol Methan gebildet werden, in Methan-Einheiten umgerechnet (Abb. 18). Diese theoretische Methanbildung war immer größer, als die *in situ*-Methanbildung (Kontrolle), was möglicherweise auf eine teilweise Assimilation der freigesetzten Glucose zurückzuführen ist. Es zeigt sich aber, dass die Methanbildung bei Temperaturen $\geq 20^\circ\text{C}$ unter Substratsättigung über das Niveau der aus der tatsächlichen Hydrolyse möglichen Methanogenese hinaus angehoben werden kann. Dies spricht für eine Substratlimitierung der Methanogenen. Bei Temperaturen $< 20^\circ\text{C}$ hingegen wird das Niveau der aus der Hydrolyse möglichen Methanbildung mit keinem Substrat überschritten. Lediglich in Phase II nach Glucose-Zugabe war die Methanbildung schon bei 15°C höher als die aus der Hydrolyse mögliche Methanbildung. Bei niedriger Temperatur scheint die Methanogenese temperaturlimitiert zu sein.

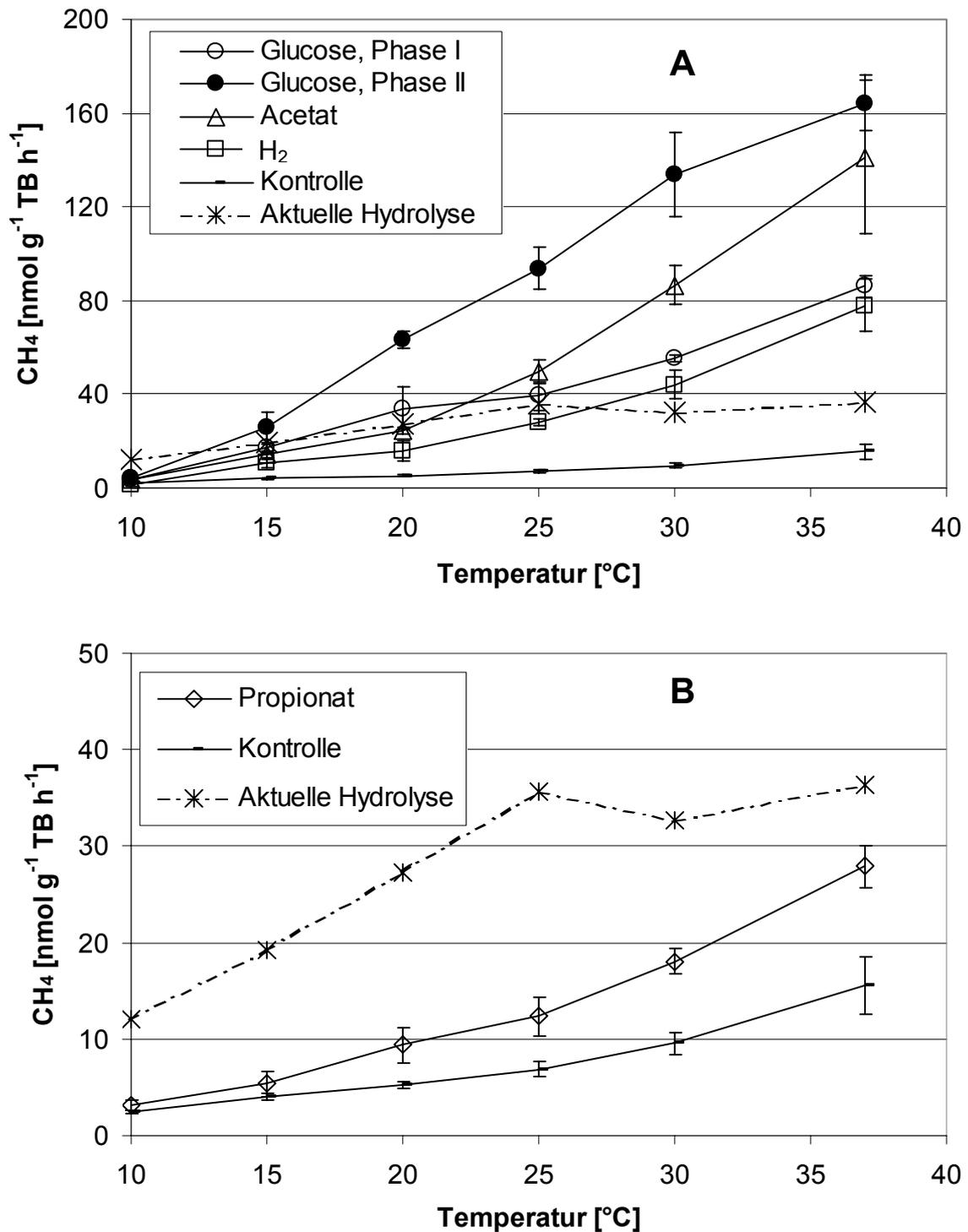


Abb. 18: Methan-Produktionsraten in anaerob inkubiertem Reisfeldboden nach Zugabe verschiedener Substrate und im Kontrollversuch (ohne Substratzugabe). Nach der Stimulation mit Glucose konnten zwei Phasen unterschiedlicher Stimulation der Methan-Bildung beobachtet werden. Die aktuelle Hydrolyse entspricht der Rate der Glucose-Akkumulation nach Hemmung mit Toluol. Diese Werte wurden zum Vergleich in potentielle Methan-Bildung umgerechnet. Mittelwerte \pm Standardabweichungen.

Als Maß für den Effekt der Temperatur auf die Methanbildung nach Substratzugabe wurde für jedes Substrat die Aktivierungsenergie für die Methanproduktion berechnet (Tab. 14). Da sich die Methanbildungsrate zwischen 10 und 15°C stark änderte, sind die Aktivierungsenergien sowohl für den gesamten Temperaturbereich (10-37°C) als auch für den Bereich 15-37°C angegeben. Höhere Werte zeigen einen stärkeren Temperatureffekt an. Im Kontrollversuch und nach Propionat-Zugabe sind beide Werte fast gleich, was zeigt, dass die Methan-Produktion mit der Temperatur gleichmäßig zunahm. Große Differenzen zwischen beiden Werten (Glucose, H₂) hingegen zeigen, dass sich die Methanproduktion zwischen 10 und 15°C stark ändert. Den stärksten Effekt hatte die Temperatur auf die Methanbildung aus H₂ und Acetat. Glucose hingegen hatte einen etwas geringeren Effekt, was auch an der geringeren, aber über den gesamten Temperaturbereich linearen, Steigung der Methanproduktionsrate zu sehen ist (Abb. 18 A), bewirkte aber insgesamt eine stärkere Stimulation der Methanogenese.

Tab. 14: Aktivierungsenergien [kJ mol⁻¹] der Methanproduktion in anaerob inkubiertem Reisfeldboden nach Zugabe verschiedener Substrate im Vergleich zur Kontrolle. Werte wurden unter Einbeziehung aller Temperaturen (10-37°) und für den Bereich 15-37°C berechnet. Mittelwerte ± Standardabweichungen (n=5).

	10-37°C	15-37°C
Kontrolle	45 ± 6	46 ± 6
Glucose, Phase I	78 ± 4	50 ± 5
Glucose, Phase II	93 ± 3	61 ± 5
Propionat	59 ± 3	56 ± 6
Acetat	96 ± 5	80 ± 7
H₂	98 ± 9	69 ± 8

3.4 Substratumsatzraten unter *in situ*-Bedingungen

Die im folgenden beschriebenen Versuche wurden unter meiner Anleitung von Tanja Hoffmann im Rahmen ihres Laborpraktikums durchgeführt. Durch Zugabe von ^{14}C -markierten Substraten sollte die *in situ*-Umsatzrate von Glucose, Propionat und Acetat bestimmt werden. Aus der Umsatzzeit ist ersichtlich, dass Glucose bei 15°C schneller umgesetzt wurde als Propionat und Acetat (Tab. 15). Bei 30°C war der Unterschied zwischen den Umsatzzeiten weniger deutlich. Verrechnet mit dem jeweiligen Substrat-Pool zeigt sich, dass die Umsatzrate bei beiden Temperaturen für Acetat > Propionat > Glucose war. Der Vergleich zwischen 15°C und 30°C zeigt, dass die Glucose-Umsatzrate kaum, die Propionat-Umsatzrate nur gering, die Acetat-Umsatzrate hingegen sehr stark temperaturabhängig war. Es muss jedoch angemerkt werden, dass die Wiederfindung des Acetat- und Propionat-Versuchs bei 30°C mit 49 bzw. 39% sehr gering war. Der RI-Wert des Acetat-Umsatzes zeigt, dass $2\text{-}^{14}\text{C}$ -Acetat ausschließlich reduktiv abgebaut wurde, also zu Methan. Das markierte C in $2\text{-}^{14}\text{C}$ -Propionat wurde hingegen zu etwa gleichen Teilen in CO_2 und CH_4 eingebaut (RI=0,4 bzw. 0,5; Tab. 15). $2\text{-}^{14}\text{C}$ -Propionat wurde zu Acetat, CH_4 und CO_2 umgesetzt. Die Markierung von U- ^{14}C -Glucose wurde bei 30°C in Acetat und CH_4 und nach längerer Inkubation in Propionat wiedergefunden. CO_2 konnte erst nach 120 min und nur im Porenwasser detektiert werden. Bei 15°C wurde nur CH_4 als Endprodukt der U- ^{14}C -Glucose-Verwertung nachgewiesen.

Da das markierte C des Acetat vollständig zu Methan umgesetzt wurde, lässt sich die Umsatzrate des $2\text{-}^{14}\text{C}$ -Acetat mit CH_4 -Bildung in der Kontrolle (Methan-Bildung ohne Substrat-Zugabe) vergleichen (Tab. 16). Dabei zeigte sich zumindest eine ungefähre Übereinstimmung der Werte - wenn auch mit einer Überschätzung der Produktion bei 30°C für Acetat - als Hinweis darauf, dass ein Großteil des Methans aus Acetat gebildet wurde. Die deutlich geringeren Umsatzraten des $2\text{-}^{14}\text{C}$ -markierten Propionats deuten hingegen eine geringere Beteiligung von Propionat am methanogenen Abbau in Reisfeldboden an. Dies zeigte sich auch an der sehr geringen Stimulation der Methanogenese nach Propionat-Zugabe. Der Umsatz von im Überschuss vorhandenem Acetat und die Methanbildung daraus stimmten bei allen Temperaturen gut überein (Tab. 16) und war bei 15 und 30°C etwa fünffach höher als der *in situ*-Umsatz. Im Fall des Propionats war diese Übereinstimmung weniger gut, da zum einen Propionat meist nur unvollständig umgesetzt wurde und zum anderen mit 1,5 mM nur relativ wenig Substrat

zugegeben wurde. Hier zeigte sich nur ein geringfügig (30°C) bzw. gar nicht (15°C) erhöhter Propionat-Umsatz nach Substrat-Zugabe gegenüber der ^{14}C -Markierung. Die Umsatzrate von Glucose im Überschuss konnte nicht bestimmt werden. Die im ^{14}C -Versuch bestimmte Umsatzrate war aufgrund des sehr geringen Substratpools (Tab. 14) erheblich geringer als die Methanbildung der Kontrolle (Tab. 16).

Tab. 15: Umsatz von ^{14}C -markierten Substraten in anaerob inkubiertem Reisfeldboden. Angegeben sind die Mittelwerte (n=2). Die Abweichung der Einzelwerte war immer <10%.

15°C

Substrat	2- ^{14}C -Acetat	2- ^{14}C -Propionat	U- ^{14}C -Glucose
Umsatzkonstante k (h^{-1})	0,2	0,4	1,2
r^2	0,94	0,93	0,96
Umsatzzeit (h)	5,6	2,9	0,8
Poolgröße (μM)	25	5	0,13
Umsatzrate ($\mu\text{M h}^{-1}$)	4,5	1,7	0,2
RI-Wert	0	0,4	0
Wiederfindung (%)	69	69	83

30°C

Substrat	2- ^{14}C -Acetat	2- ^{14}C -Propionat	U- ^{14}C -Glucose
Umsatzkonstante k (h^{-1})	1,1	0,5	1,4
r^2	0,79	0,83	0,97
Umsatzzeit (h)	0,9	2,1	0,7
Poolgröße (μM)	16	5	0,20
Umsatzrate ($\mu\text{M h}^{-1}$)	17,2	2,4	0,3
RI-Wert	0	0,5	0
Wiederfindung (%)	49	39	83

Tab. 16: Vergleich des Umsatzes von ^{14}C -markiertem und im Überschuss vorhandenem Acetat (15 mM), Propionat (1,5 mM) und Glucose mit der potentiellen Methan-Bildung aus diesen Substraten und der Methanbildung ohne Substratzugabe (Kontrolle) in anaerob inkubiertem Reisfeldboden. Der Umsatz von im Überschuss vorhandenem Acetat bzw. Propionat wurde aus der linearen Konzentrations-Abnahme berechnet. Die Raten der Kontrolle stammen aus 2 unabhängigen Versuchen. Mittelwerte \pm Standardabweichungen.

Temperatur ($^{\circ}\text{C}$)	10	15	20	25	30	37
2-^{14}C-Acetat-Umsatz		4,5			17,2	
Acetat-Umsatz	$3,2 \pm 1,5$	$22,2 \pm 7,2$	$21,7 \pm 2,7$	$56,2 \pm 2,8$	$83,2 \pm 3,9$	$92,1 \pm 4,6$
CH₄-Bildung aus Acetat	$3,6 \pm 0,3$	$14,1 \pm 1,6$	$24,4 \pm 1,6$	$49,7 \pm 1,1$	$86,5 \pm 8,1$	$141,2 \pm 32,6$
Kontrolle	$2,4 \pm 0,2$	$4,0 \pm 0,3$	$5,2 \pm 0,4$	$6,9 \pm 0,8$	$9,6 \pm 1,1$	$15,6 \pm 3,0$
2-^{14}C-Propionat-Umsatz		1,7			2,4	
Propionat-Umsatz	$0,2 \pm 0,1$	$1,1 \pm 0,1$	$2,7 \pm 0,6$	$4,0 \pm 1,1$	$6,9 \pm 0,4$	$20,9 \pm 7,9$
CH₄-Bildung aus Propionat	$3,1 \pm 0,5$	$5,4 \pm 1,3$	$9,4 \pm 1,8$	$12,3 \pm 2,0$	$18,1 \pm 1,3$	$27,9 \pm 2,2$
Kontrolle	$4,2 \pm 0,8$	$3,5 \pm 0,2$	$6,8 \pm 0,7$	$10,3 \pm 0,8$	$10,8 \pm 0,3$	$15,6 \pm 0,9$
U-^{14}C-Glucose-Umsatz		0,2			0,3	
CH₄-Bildung aus Glucose I	$3,3 \pm 0,4$	$17,1 \pm 1,9$	$34,0 \pm 8,8$	$39,3 \pm 6,1$	$55,4 \pm 1,3$	$86,2 \pm 4,8$
CH₄-Bildung aus Glucose II	$4,2 \pm 0,8$	$25,7 \pm 6,5$	$63,3 \pm 3,9$	$93,8 \pm 8,8$	$134,1 \pm 18,0$	$164,3 \pm 12,1$
Kontrolle	$4,2 \pm 0,8$	$3,5 \pm 0,2$	$6,8 \pm 0,7$	$10,3 \pm 0,8$	$10,8 \pm 0,3$	$15,6 \pm 0,9$

IV. Diskussion

1 Einfluss der Temperatur auf die Methanbildung und die daran beteiligte mikrobielle Gemeinschaft im physiologischen Temperaturbereich

Im Rahmen dieser Arbeit sollte der Effekt verschiedener konstanter Temperaturen auf die Methanbildung unter Steady-State-Bedingungen in einem methanogenen Reisfeldboden untersucht werden. Zunächst waren dabei die Methanogenese direkt und die an der Methan-Bildung beteiligte mikrobielle Gemeinschaft im *in situ*-Temperaturbereich von Interesse. Die Bodentemperaturen in den italienischen Reisfeldern in Vercelli liegen während der Vegetationsperiode bei ca. 15-30°C (Schütz *et al.* 1990). Entsprechend wurde der Bereich 10-37°C für die Durchführung der Versuche gewählt. Es handelt sich dabei um künstliche Bedingungen, da die Temperaturen im Reisfeldboden tages- und jahrszeitlichen Schwankungen unterliegen. Trotzdem dienen sie als Modell, um den prinzipiellen Effekt der Temperatur auf die Struktur und Funktion der methanogenen mikrobiellen Gemeinschaft zu untersuchen.

In Anlehnung an die in Anhang A zu findende Veröffentlichung "The effect of temperature on carbon and electron flow and on the archaeal community in methanogenic rice field soil" sollen hier die wichtigsten Punkte diskutiert werden.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Temperatur nicht nur die Rate der Methanproduktion beeinflusst, sondern auch den Weg des Kohlenstoff- und Elektronenflusses während des methanogenen Abbaus organischer Substanz und die Zusammensetzung der methanogenen mikrobiellen Gemeinschaft. Mit steigender Temperatur nahm der Kohlenstoff-Fluss über Acetat relativ zum Fluss über H₂/CO₂ ab. Die Steady-State-Konzentration von H₂ stieg mit der Temperatur an, was ein konstantes ΔG der H₂-abhängigen Methanogenese bewirkte. Die Acetat-Konzentration hingegen nahm mit der Temperatur ab, was in einer verringerten verfügbaren Energie für acetoklastische Methanogenese resultierte. Gleichzeitig wurde die acetoklastische methanogene mikrobielle Gemeinschaft verstärkt durch *Methanosaetaceae* im Vergleich zu *Methanosarcinaceae* dominiert. Diese Ergebnisse ergeben erstmals ein umfassendes Bild darüber, wie die Temperatur die Struktur der mikrobiellen Gemeinschaft und die Funktion eines methanogenen Habitats beeinflusst.

1.1 Einfluss der Temperatur auf die CH₄-Bildung

In Bodenaufschlammungen, die bei 30°C vorinkubiert wurden, begann die Methanproduktion nach einer zweitägigen lag-Phase, während der Eisen und Sulfat reduziert wurden und organisches Material vorwiegend zu CO₂ abgebaut wurde. Auf diese Reduktionsphase folgten relativ hohe CH₄-Produktionsraten, die nach und nach zurückgingen bis ein Steady-State der CH₄-Produktionsrate auf relativ niedrigem Niveau erreicht wurde. Die Phase der sequentiellen Reduktion und die verschiedenen Phasen der Methanproduktion wurden für verschiedene Reisfeldböden detailliert beschrieben (Yao *et al.*, 1999; Yao und Conrad, 1999b). Yao *et al.* (1999) schlugen ein 3-Phasen-Modell vor mit (I) Reduktionsphase, (II) methanogener Phase und (III) Steady-State-Phase, aus dem von van Hulzen *et al.* (1999) ein Prozeß-Modell entwickelt wurde. Das Modell zeigt, dass die Methanogenese zunächst durch die Methanogenen selbst (II) und später durch die Kohlenstoff-Mineralisationsrate (III) limitiert ist. Der Effekt der Temperatur auf die lag-Phase bis zum Erreichen des Steady-State wurde charakterisiert (Yao und Conrad, 2000a; van Hulzen *et al.* 1999) und stimmt mit den Ergebnissen dieser Arbeit überein.

Steady-State-Bedingungen wurden nach 60-90 Tagen Inkubation erreicht, abhängig von der Inkubations-Temperatur. Die Methan-Produktionsraten im Steady-State stiegen mit der Temperatur mit einer Aktivierungsenergie von 61 kJ mol⁻¹ oder einem Q₁₀ von 1,8-2,8 an, was in der gleichen Größenordnung liegt wie bei früheren Untersuchungen mit Mikrokosmen aus Reisfeldboden und C-limitierten Bodenaufschlammungen (Schütz *et al.* 1990; van Hulzen *et al.*, 1999; Yao und Conrad, 2000a).

1.2 H₂-Steady-State-Konzentration

Die H₂ Partialdrücke zeigten einen klaren Anstieg mit der Temperatur. Gleiche Ergebnisse wurden mit Süßwasser-Sedimenten (Westermann, 1994), marinen Sedimenten (Hoehler *et al.* 1998) und mit Reinkulturen von Methanogenen (Conrad und Wetter, 1990) erzielt. Dieser Anstieg bewirkte einen konstanten Level der Gibbschen freien Energie (ΔG) von -20 bis -25 kJ mol⁻¹ CH₄ im gesamten untersuchten Temperaturbereich. Diese freie Energie sollte für die Bildung von 1/3 ATP ausreichen (ca. -23 kJ mol⁻¹), was als minimaler Energiebedarf für mikrobielles Wachstum angesehen wird (Schink, 1997). Ähnliche Werte wurden in verschiedenen Reisfeldböden der wichtigsten Anbauggebiete (Yao und Conrad, 1999a), Reisfeldboden nach Strohzugabe (Glissmann und Conrad, 2000) und anderen methanogenen Habitaten (Übersicht in Conrad, 1999) gefunden. Alle diese Daten sprechen

für das Konzept, dass H₂-abhängige Methanogenese thermodynamisch kontrolliert ist. Daraus folgt, dass die aus den H₂-Partialdrücken berechneten Gibbschen freien Energien eher für ein methanogenes Habitat charakteristisch sind (Conrad und Wetter, 1990; Conrad, 1996; Hoehler *et al.*, 1998), als die H₂-Partialdrücke selbst (Lovley und Goodwin, 1988).

1.3 Acetat-Steady-State-Konzentration

Im Gegensatz zu H₂ stieg die Acetat-Steady-State-Konzentration nicht mit der Temperatur an, sondern nahm bis ca. 20°C sogar ab und blieb dann konstant auf sehr niedrigem Niveau. Entsprechend sank die für die acetoklastische Methanogenese verfügbare Energie mit der Temperatur. Offensichtlich hat Acetat nicht die gleiche regulatorische Funktion für die Methanogenese wie H₂. Diese Schlussfolgerung deckt sich mit den Ergebnissen von Westermann (1994), der eine konstante Acetat- und Propionat-Konzentration zwischen 2 und 37°C nachwies. Sie deckt sich aber auch mit der Untersuchung verschiedener Reisfeldeböden, in denen gezeigt wurde, dass nur das ΔG der H₂-abhängigen, aber nicht das der Acetat-abhängigen Methanogenese die gesamte Methanproduktion reguliert (Yao und Conrad, 1999a).

1.4 Beitrag von H₂/CO₂ und Acetat zur Methanproduktion

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass der relative Anteil hydrogenotropher Methanbildung mit der Temperatur anstieg und daraus resultierend der Anteil acetoklastischer Methanogenese sank. Dies steht im Widerspruch zu Beobachtungen in Gezeiten-beeinflussten Süßwassersedimenten, wo die Methanbildung aus CO₂ im Temperaturbereich 8 bis 32°C konstant bei 25% lag (Avery und Martens, 1999), deckt sich aber mit früheren Studien in anoxischem Reisfeldeboden, die allerdings auf zwei Temperaturen beschränkt waren (Conrad *et al.*, 1987; Chin und Conrad, 1995). Es bieten sich drei mögliche Erklärungen für den beobachteten verringerten Anteil hydrogenotropher Methanogenese mit sinkender Temperatur:

- 1.) Der Anteil der Homoacetogenese am C- und Elektronenfluss steigt mit sinkender Temperatur, was in einem relativen Anstieg von Acetat als methanogenes Substrat resultiert.

- 2.) Die Zusammensetzung der methanogenen mikrobiellen Gemeinschaft und damit auch die relative Aktivität der einzelnen physiologischen Gruppen ändert sich in Abhängigkeit von der Temperatur.
- 3.) Die Fluidität der cytoplasmatischen Membran ändert sich mit der Temperatur, was den Umsatz von Acetat beeinflussen kann.

1.5 Membran-Fluidität

Mikroorganismen passen sich an sinkende Temperaturen an, indem sie die Fettsäure-Zusammensetzung der cytoplasmatischen Membran so verändern, dass einer erhöhten Viskosität entgegengewirkt wird. Trotzdem resultieren sinkende Temperaturen häufig in einer reduzierten Effizienz der Transportproteine und damit einer verringerten Substrat-Affinität (Nedwell, 1999). Da Acetat aktiv über die Membran transportiert werden muss, während H₂ frei diffundiert, könnte man vermuten, dass niedrige Temperaturen den Umsatz von Acetat stärker hemmen als den von H₂. Genau dieser Effekt konnte in Kulturen von *Methanosarcina barkeri* bestätigt werden (Westermann *et al.* 1989). Mit diesem Effekt ließe sich der beobachtete Anstieg der Acetat-Konzentration bei niedrigen Temperaturen erklären. Warum die Bedeutung von Acetat als methanogenes Substrat bei niedriger Temperatur steigt, lässt sich damit jedoch nicht erklären. Es sei noch angemerkt, dass sich die Temperatur-Kompensation einzelner Spezies voneinander unterscheidet. Deshalb kann sich eine so komplexe mikrobielle Gemeinschaft, wie sie im Reisfeldboden zu erwarten ist, möglicherweise besser an Temperaturänderungen anpassen als eine einzelne Spezies.

1.6 Die methanogene mikrobielle Gemeinschaft

Es zeigte sich eine relativ komplexe Gemeinschaft von *Archaea* im Reisfeldboden, die sich in ihrer Zusammensetzung mit der Temperatur änderte. Die T-RFLP-Analyse zeigte das Vorhandensein der meisten der vorher in italienischem Reisfeldboden detektierten phylogenetischen Gruppen (Großkopf *et al.*, 1998a,b; Chin *et al.*, 1999a; Lueders und Friedrich, 2000). Am deutlichsten war der Anstieg der relativen Abundanz der *Methanosaetaceae* mit anstiegender Temperatur, verbunden mit dem Rückgang der *Methanosarcinaceae*. Die Ergebnisse der T-RFLP-Analyse sind zwar nicht ganz eindeutig, da die für *Methanosarcinaceae* und *Methanosaetaceae* charakteristischen T-RFs teilweise auch durch T-RFs von Rice Cluster IV, V und VI verursacht werden können (Chin *et al.*,

1999a; Lueders und Friedrich, 2000). Trotzdem passen die Ergebnisse sehr gut mit der Beobachtung zusammen, dass die Acetat-Konzentration bei niedrigen Temperaturen sehr viel höher waren als bei hohen Temperaturen und der Tatsache, dass *Methanosaetaceae* einen sehr viel niedrigeren Schwellenwert für die Acetat-Verwertung haben als *Methanosarcinaceae* (Jetten *et al.*, 1990, 1992). Daraus folgt, dass *Methanosarcinaceae* möglicherweise nicht in der Lage sind, bei höheren Temperaturen Acetat zu verwerten und deshalb durch die besser angepassten *Methanosaetaceae* verdrängt werden. Dennoch kann nicht völlig ausgeschlossen werden, dass diese Änderung der relativen Abundanzen auf andere Gruppen als *Methanosarcinaceae* und *Methanosaetaceae* zurückzuführen ist.

Auf den ersten Blick scheinen diese Ergebnisse früheren Beobachtungen zu widersprechen, die zeigten, dass sowohl in Reisfeldboden als auch in mit Reisfeldboden inokulierten anaeroben Zellulose-abbauenden Anreicherungen bei 30°C *Methanosarcinaceae* und bei 15°C *Methanosaetaceae* dominierten (Chin *et al.*, 1999a,b). Allerdings waren die Acetat-Konzentrationen in diesen früheren Experimenten immer >100 µM, so dass *Methanosarcinaceae* nicht durch ihren hohen Schwellenwert für Acetat diskriminiert wurden. Unter diesen Bedingungen wirkte offensichtlich die Temperatur selbst oder ein temperaturabhängiger Faktor selektierend für *Methanosaetaceae* bei niedriger und für *Methanosarcinaceae* bei hoher Temperatur. Die Fähigkeit zur Anpassung an eine veränderte Membranfluidität (s.o.) könnte ebenfalls eine Rolle spielen. Es scheint einen direkten Temperatureffekt zu geben, der in Kurzzeitexperimenten selektierend wirkt (Chin *et al.*, 1995; 1999a) sowie einen indirekten Effekt, der unter Steady-State-Bedingungen über die Acetat-Konzentration selektierend wirkt.

Zunehmende Temperatur bewirkte auch eine Abnahme der relativen Abundanz des zu den *Euryarchaeota* gehörenden Rice Cluster I. Aufgrund der phylogenetischen Position von Rice Cluster I (Großkopf *et al.*, 1998b) und dem Vorhandensein in methanogenen Anreicherungen (Lehmann *et al.*, 1999) enthält dieser Cluster wahrscheinlich Methanogene. Lueders *et al.* (2001) konnten darüber hinaus die für Methanogene spezifischen Gene der Methyl-Coenzym-M-Reduktase α -Untereinheit in Anreicherungen mit fast ausschließlich Rice Cluster I nachweisen. Um endgültige Aussagen über die Physiologie dieser Gruppe machen zu können, sind Reinkulturen nötig.

1.7 Homoacetogenese

Obwohl die Temperatur einen klaren Effekt auf die Zusammensetzung der Gemeinschaft der Archaea zeigte, erklärt dies noch nicht den Einfluss auf den Kohlenstoff- und Elektronenfluss, insbesondere warum Acetat als methanogenes Substrat bei niedrigen Temperaturen über H_2/CO_2 dominiert.

Eine mögliche Erklärung wäre, dass die H_2/CO_2 -abhängige Acetat-Produktion weniger temperaturempfindlich war als die H_2/CO_2 -abhängige Methanogenese. Allerdings konnte in früheren Studien gezeigt werden, dass hydrogenotrophe Homoacetogene eine Gibbsche freie Energie von mindestens -5 bis -6 kJ mol^{-1} H_2 benötigen (Conrad und Wetter, 1990), was -20 bis -24 kJ mol^{-1} Acetat entspricht. Die negativsten Werte in der vorliegenden Arbeit betragen jedoch nur -7 kJ mol^{-1} Acetat. Ähnlich ungünstige Werte wurden auch vorher in anoxischem Reisfeldboden beobachtet (Chin und Conrad, 1995; Roy *et al.*, 1997; Glissmann und Conrad, 2000). Daraus lässt sich schließen, dass Homoacetogenese aus H_2/CO_2 nur eine geringe Rolle spielen kann. Auch in anderen Studien konnte gezeigt werden, dass $<10\%$ des Acetat über ^{14}C -markiertes CO_2 gebildet wurden (Thebrath *et al.*, 1992; Rothfuss und Conrad, 1993b). Da Homoacetogene sehr vielseitige Organismen sind (Drake, 1994), kann man vermuten, dass psychrotolerante Homoacetogene an der Acetat-Bildung aus Sacchariden oder anderen organischen Substraten beteiligt sind (Chin und Conrad, 1995). Die Änderung der Standard Gibbschen freien Energie (ΔG^0) der Acetat-Bildung durch homoacetogene Zucker-Fermentation wird nur gering durch die Temperatur beeinflusst, was aus der geringen Änderung der Standard-Entropie ersichtlich ist ($\Delta S^0 = 0,04$ $\text{kJ mol}^{-1} \text{K}^{-1}$; Anhang A, Tab. 1), weil $\Delta G^0_T = \Delta G^0 - \Delta S^0 (T-298,14)$. Andererseits wird der methanogene Acetat-Verbrauch bei sinkender Temperatur weniger exergon ($\Delta S^0 = 0,31$ $\text{kJ mol}^{-1} \text{K}^{-1}$) und muss daher durch steigende Acetat-Konzentrationen ausgeglichen werden, was auch beobachtet wurde.

1.8 Isotopie

Die Bestimmung der Isotopensignatur von CH_4 , CO_2 und Acetat sollte ergänzend zur Markierung mit ^{14}C -Bicarbonat Informationen über die Anteile der Substrate an der Methanogenese liefern. Die bestimmten Isotopen-Werte stellen nur Punktmessungen dar, müssen also als Summenwerte über den gesamten Inkubationszeitraum angesehen werden. Sugimoto und Wada (1993) fanden jedoch schon ab ca. 5 Wochen Inkubation konstante

Werte, so dass auch diese Punktmessungen geeignet sein dürften, das Habitat zu beschreiben.

Die gemessenen $\delta^{13}\text{C}$ -Werte des gebildeten CH_4 und des CO_2 lagen bei 10 bis 37°C (Abb. 3) im Bereich der in limnischen Habitaten und Reisfeldboden gemessenen Werte (-50 bis -65‰ bzw. -5 bis -25‰; Whiticar *et al.*, 1986; Sugimoto und Wada, 1993; Chidthaisong und Watanabe, 1997; Bilek *et al.*, 1999). Das resultierende α_{CO_2} lag wie zu erwarten zwischen 1,04 und 1,05 (Abb. 4) und war damit wie das gemessene $\delta^{13}\text{CH}_4$ im Bereich der in der Literatur angegebenen Werte für Süßwasserhabitats (Whiticar *et al.*, 1986; Hornibrook *et al.*, 2000). Auch das $\delta^{13}\text{C}$ der organischen Substanz des Bodens entsprach mit -25,6‰ fast den Angaben von Hornibrook *et al.* (2000) von -27,6‰ für Pflanzenmaterial und war fast identisch mit dem gemessenen $\delta^{13}\text{C}$ des Acetat bei 15-37°C. Bei der Bildung des Acetat und damit auch bei der vorhergehenden Fermentation scheint es also zumindest in diesem Temperaturbereich zu keiner nennenswerten Fraktionierung zu kommen (Blair *et al.*, 1993).

Da mit zunehmender Temperatur der Anteil hydrogenotropher Methanogenese, wie im ^{14}C -Versuch festgestellt, anstieg, sollte auch das $\delta^{13}\text{CH}_4$ negativer werden, da CO_2 einen deutlich stärkeren isotopischen Effekt hat als Acetat (Games *et al.*, 1978; Krzycki *et al.*, 1987; Gelwicks *et al.*, 1994; Botz *et al.*, 1996). Ein negativeres $\delta^{13}\text{CH}_4$ würde demnach auf eine CO_2 -Reduktion hindeuten, während ein relativ positiver Wert für einen höheren Anteil acetoklastischer Methanogenese sprechen würde. Im Gegensatz dazu wurde das $\delta^{13}\text{CH}_4$, aber auch das $\delta^{13}\text{CO}_2$, mit zunehmender Temperatur positiver (Abb. 3), was auch in mehreren Studien vorher gefunden wurde (Whiticar *et al.*, 1986; Blair *et al.*, 1993; Jedrysek, 1999). In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass sich die Isotopenfraktionierung von CO_2 mit abnehmender Temperatur verstärkt, $\delta^{13}\text{CH}_4$ aus CO_2 bei niedriger Temperatur also negativer wird (Blair *et al.*, 1993; Botz *et al.*, 1996; Whiticar, 1999). Neben diesem reinen Temperatureffekt auf die Isotopenfraktionierung ist möglicherweise auch das CO_2 durch die höheren Umsatzraten bei höherer Temperatur angereichert an ^{13}C (Avery und Martens, 1999). Dies würde nicht nur den linearen Anstieg des $\delta^{13}\text{CO}_2$ mit ansteigender Temperatur erklären, sondern auch die daraus resultierenden positiveren $\delta^{13}\text{CH}_4$ -Werte.

Das $\delta^{13}\text{C}$ des Acetat war mit -19‰ bei 10°C viel zu positiv, um die sehr negativen $\delta^{13}\text{C}$ -Werte des gebildeten Methans zu erklären. Dies relativiert sich dadurch, dass Acetat

intramolekular fraktioniert ist (Botz *et al.*, 1996), wobei das $\delta^{13}\text{C}$ der Methylgruppe (die Messung war technisch nicht möglich) meist um ca. 5-10‰ negativer ist als das $\delta^{13}\text{C}$ des gesamten Moleküls (Blair und Carter, 1992; Sugimoto und Wada, 1993). Allerdings zeigt die Methanbildung aus Acetat im Gegensatz zur Methanbildung aus CO_2 nur einen geringen isotopischen Effekt (Games *et al.*, 1978; Krzycki *et al.*, 1987; Gelwicks *et al.*, 1994, Botz *et al.*, 1996), wobei die Fraktionierung unter Steady-State-Bedingungen nur noch minimal ist (Blair und Carter, 1992).

Das sehr negative $\delta^{13}\text{C}$ des Methan bei 10°C lässt sich nicht durch die starke Fraktionierung von CO_2 erklären, da bei dieser Temperatur nur ca. 13% des Methan über H_2/CO_2 gebildet wurden. Die Fraktionierung müsste hier mit $\alpha=1,3$ extrem hoch sein (Tab. 9). Hierfür bieten sich zwei Erklärungen an:

- 1.) Das Acetat wird zumindest teilweise homoacetogen gebildet.
- 2.) Bei 10°C spielt ein noch nicht identifiziertes stark fraktionierendes Substrat eine größere Rolle.

Homoacetogene Acetatbildung hat einen starken KIE („kinetic isotopic effect“ – kinetischen Isotopeneffekt), bewirkt also eine starke Isotopenfraktionierung (Gelwicks *et al.*, 1989). Daraus folgt, dass das $\delta^{13}\text{C}$ des Acetat negativer sein müsste als bei fermentativ gebildetem Acetat. Da aber im Gegensatz dazu das $\delta^{13}\text{C}$ -Acetat bei 10°C positiver als bei allen anderen Temperaturen war, scheidet diese Möglichkeit aus.

Der Anteil von Acetat an der Methanogenese wurde aus der Bestimmung des Anteils hydrogenotropher Methanogenese ermittelt. Bei 10°C könnte aber auch ein anderes bisher nicht identifiziertes Substrat eine größere Rolle spielen. Dies könnte Methanol oder eine methylierte Verbindung wie Trimethylamin (TMA) oder Dimethylsulfid (DMS) sein, die eine sehr starke Fraktionierung aufweisen und eine Verschiebung des $\delta^{13}\text{C}$ vom Substrat zum Methan um bis zu -70% bewirken können (Krzycki *et al.*, 1987; Summons *et al.*, 1998). MPN-Bestimmungen in verschiedenen Reisfeldeböden ergaben mit bis zu 5×10^5 methylotrophen Methanogenen g^{-1} TB gleich hohe oder höhere Zellzahlen wie für acetoklastische Methanogene (Asakawa und Hayano, 1995; Asakawa *et al.*, 1998; Joulain *et al.*, 1998; Ramakrishnan *et al.*, 1998). Diese waren meist *Methanosarcinaceae* (Joulain *et al.*, 1998), deren relative Abundanz bei 10°C im Reisfeldeboden erhöht war (Kapitel 1.6). Methylotrophe Methanogenese könnte also durchaus bei niedriger Temperatur eine größere Rolle in Reisfeldeböden spielen. Im Sediment des Bodensees konnte gezeigt

werden, dass die Methanbildung aus Methanol bei 20°C thermodynamisch sehr günstig ist (Schulz und Conrad, 1996) und im Sediment des Plußsee konnte bei 4°C ein Umsatz von ¹⁴C-Methanol nachgewiesen werden. Eine Stimulation der Methanbildung durch höhere Methanol-Konzentrationen wurde bei niedriger Temperatur jedoch nicht beobachtet. Methanol schied dort also als wichtiges Substrat der Methanogenen bei niedriger Temperatur aus (Nüsslein und Conrad, 2000). In zukünftigen Experimenten sollte näher untersucht werden, ob Methanol oder andere methylierte Verbindungen im Reisfeldboden bei niedriger Temperatur nachweisbar sind und ob sie unter *in situ*-Bedingungen umgesetzt werden.

Insgesamt zeigt sich, dass die vorgenommenen Punktmessungen unter Steady-State-Bedingungen noch kein vollständiges Bild der ablaufenden Prozesse liefern. Vor allem sind Daten über die zeitliche Änderung der Isotopie nötig. Diese könnten Aufschluss über Änderungen der Abbauwege geben, die zumindest zu Beginn der Inkubation zu erwarten sind. Die im Steady-State gemessenen Werte können daher nur als Summe dieser Prozesse angesehen werden.

1.9 Theoretische und tatsächlich Zellzahlen

Tijhuis *et al.* (1993) konnten nachweisen, dass die „maintenance energy“ (Erhaltungsenergie), also die Energie die ein Organismus für den Erhaltungsstoffwechsel benötigt, unabhängig ist vom Organismus, dem verwendeten Elektronenakzeptor, dem verwendeten Elektronendonator und sogar fast unabhängig davon, ob der Organismus aerob oder anaerob lebt. Die Temperatur hat hingegen einen sehr starken Einfluss auf die maintenance energy (Aktivierungsenergie: 69,4 kJ). Aus der maintenance energy leitete Harder (1997) die potentielle Zellzahl unter Steady-State-Bedingungen ab. Unter Verwendung dieser Berechnung wurden die Zellzahlen hydrogenotropher Methanogener im Reisfeldboden im Bereich 10-37°C abgeschätzt (Abb. 5).

Die höchsten Zellzahlen wurden für 25 und 30°C abgeschätzt. Bei 37°C war die Zellzahl etwas geringer, was auf die deutlich höhere maintenance energy und die gleichzeitig etwas erniedrigte Gibbsche freie Energie (ΔG ; Anhang A, Abb. 3) bei dieser Temperatur zurückzuführen ist. Die MPN-Bestimmungen bei 10, 25 und 37°C und die Berechnung der theoretischen Zellzahl stimmten bei 25 und 37°C fast überein (Abb. 5). Dies zeigt deutlich, dass sich die für die Versuche verwendeten 60 bis 90 Tage vorinkubierten Bodenaufschlammungen im Steady-State befanden, da diese theoretische Zellzahl nur

erreicht werden kann, wenn das ΔG , also die freie Energie unter aktuellen Bedingungen, vollständig für den Erhaltungsstoffwechsel („maintenance energy“) verwendet wird. Wenn noch ein Wachstum vorhanden wäre, müsste die aktuelle Zellzahl geringer sein, da bei der maximalen Zellzahl keine Energie mehr für ein Wachstum zur Verfügung steht. Tijhuis *et al.* (1993) gaben eine Korrelation an, über die die maintenance energy berechnet werden kann. Für die Zellzahlberechnung wurde die für anaerobe Organismen angegebene Gleichung verwendet, da nur dadurch die über MPN-Bestimmungen ermittelten Zellzahlen reproduzierbar waren. Die für aerobe und anaerobe gemittelte Gleichung ergab hingegen zu geringe Zellzahlen (nicht dargestellt). Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, dass sich die methanogene Population im Steady-State und nicht mehr im Wachstum befand.

Bei 10°C wurde im Gegensatz zu den anderen Temperaturen eine deutlich geringe Zellzahl bestimmt, als durch die Abschätzung vorhergesagt wurde. Der Grund dafür könnte ein schnelleres Wachstum Homoacetogener sein, die aufgrund der hohen zu den Kulturen zugegebenen H₂-Konzentration mit den Methanogenen konkurrieren können. So konnten Schulz und Conrad (1996) im Sediment des Bodensees in MPN-Reihen bei 6°C keine Methanogenen, bei 20°C hingegen 10⁵ hydrogenotrophe Methanogene ml⁻¹ auf H₂/CO₂ nachweisen, obwohl bei beiden Temperaturen Methanbildung zu beobachten war. Es wurde daraus geschlossen, dass bei der niedrigen Temperatur Acetat homoacetogen gebildet und von acetoklastischen Methanogenen verwertet wird.

Bei MPN-Bestimmungen in verschiedenen Reisfeldböden wurden je nach Boden mit 10² bis 2×10⁶ g⁻¹ TB hydrogenotrophen, <10 bis 3×10⁴ acetoklastischen und <10 bis 5×10⁵ methylotrophen Methanogenen teilweise sehr geringe Zellzahlen gefunden (Joulian *et al.*, 1998; Ramakrishnan *et al.*, 1998). Diese Bestimmungen wurden allerdings an luftgetrocknetem Boden durchgeführt, in dem nach Untersuchungen von Ueki *et al.* (1997) nur ca. ¼ der Methanogen eine Lagerung überdauert. MPN-Bestimmungen in japanischem Reisfeldboden ergab 10³ bis 10⁴, nach Zugabe von kompostiertem Reisstroh jedoch bis zu 10⁵ bis 10⁶ hydrogenotrophe Methanogene g⁻¹ TB (Asakawa und Hayano, 1995; Asakawa *et al.*, 1998). In italienischem Reisfeldboden wurden 10⁵ bis 10⁷ hydrogenotrophe Methanogene gezählt (Schütz *et al.*, 1989; Mayer und Conrad, 1990; Großkopf *et al.*, 1998a; Frenzel *et al.* 1999). Der Vergleich der ermittelten Zellzahlen in italienischem Reisfeldboden zeigt demnach eine ähnliche Größenordnung wie sie in anderen Reisfeldböden gefunden wurde.

2 Thermophile Methanogene in Reisfeldboden

In Anlehnung an die in Anhang B zu findende zur Veröffentlichung eingereichte Arbeit „Thermophilic methanogens in rice field soil“ sollen hier die Ergebnisse kurz diskutiert werden.

Das beobachtete zweite Temperaturoptimum bei 50°C deutet darauf hin, dass im untersuchten Reisfeldboden thermophile Methanogene existieren. Dieses Ergebnis bestätigt frühere Studien, in denen thermophile Methanproduktion in verschiedenen Reisfeldböden beobachtet wurde (Yang und Chang, 1998; Yao und Conrad, 2000a) und zeigt, dass thermophile Methanogene möglicherweise in Böden weitverbreitet sind.

Das erste Temperaturoptimum wurde bei etwa 41°C gefunden, also deutlich oberhalb des *in situ*-Temperaturbereichs (15-30°C; Schütz *et al.*, 1990). Ähnlich hohe Temperaturoptima der Methanogenese wurden auch in verschiedenen Seesedimenten mit konstant niedriger Temperatur (<10°C) sowie in einem Festbettreaktor zur psychrophilen Abwasserreinigung gefunden (Zeikus und Winfrey, 1976; Thebrath, 1991; Nozhevnikova *et al.*, 1997; Lettinga *et al.*, 1999). Das Temperaturoptimum scheint also eher das Optimum der methanogenen mikrobiellen Gemeinschaft als die *in situ*-Bedingungen wiederzuspiegeln.

Thermophile Methanproduktion bei noch höheren Temperaturen als dem ersten Temperaturoptimum begann erst nach einer verlängerten lag-Phase von ca. 20 Tagen bei 50°C im Vergleich zu 2 Tagen bei 41°C. Eine lag-Phase vor dem Beginn thermophiler Methanproduktion wurde auch in Sedimenten tiefer Seen und in Reisfeldböden beobachtet (Kimura *et al.*, 1993; Nozhevnikova *et al.*, 1997; Yang und Chang, 1998; Yao und Conrad, 2000a). Die beobachtete lag-Phase war nicht auf eine noch nicht abgeschlossene Reduktion von Eisenoxiden oder Sulfat zurückzuführen, wie von Yao und Conrad (2000a) beschrieben, da der Boden bei 30°C bis zum Beginn der Methanbildung vorinkubiert wurde. Stattdessen ist die beobachtete lag-Phase wahrscheinlich auf das Wachstum einer im Boden vorhandenen kleinen thermophilen methanogenen Population zurückzuführen. Thermophile Methanbildung war eher durch die kleine Population thermophiler Methanogener bei *in situ*-Temperaturen als durch einen Substratmangel limitiert, da bei 50°C unter einem Überschuß an Substrat immer noch eine längere lag-Phase der Methanbildung zu beobachten war, als bei mesophilen Temperaturen.

Um methanogene Aktivität über lange Inkubationszeiten (89 Tage) möglich zu machen, ist die Nachlieferung methanogener Substrate (H_2 , CO_2 , Acetat) durch fermentierende Bakterien nötig. Im Experiment konnte gezeigt werden, dass diese Bakterien sogar bei Temperaturen von bis zu 75-80°C aktiv waren, da Fermentationsprodukte (H_2 , Acetat, Propionat) akkumulierten, wenn die Inkubationstemperatur das obere Temperaturlimit der Methanogenen (ca. 60°C) überschritt. Offensichtlich waren auch thermophile fermentierende Bakterien im Reisfeldboden vorhanden.

Acetat und H_2/CO_2 sollten beim Abbau von Polysacchariden theoretisch jeweils zu $\geq 66\%$ und $\leq 33\%$ zur Methanbildung beitragen (Conrad, 1999). Tatsächlich wurden Anteile dieser Größenordnung bei mesophilen Temperaturen in Reisfeldboden nachgewiesen (siehe Kapitel 1; Yao und Conrad, 2000b). Bei thermophiler Temperatur wurde Methan hingegen ausschließlich aus H_2/CO_2 gebildet. Acetat akkumulierte bei Temperaturen $>41^\circ C$, wurde also nicht mehr in dem Maße verbraucht, in dem es produziert wurde. Auf den ersten Blick könnte dies überraschen, da die acetoklastische Methanogenese thermodynamisch günstiger war als die hydrogenotrophe Methanogenese. Das berechnete ΔG von $-15 \text{ kJ mol}^{-1} CH_4$ aus H_2/CO_2 war deutlich höher und damit weniger exergon als normalerweise in methanogenem Reisfeldboden beobachtet ($-23 \text{ kJ mol}^{-1} CH_4$; Kapitel 1; Yao und Conrad, 1999a), was zeigt, dass die Methanogenese am thermodynamischen Schwellenwert ablief. Ähnlich hohe ΔG -Werte wurden auch in anderen methanogenen Habitaten gefunden (Westermann, 1994) und erlauben offensichtlich auch die Methanbildung in Reisfeldboden bei 50°C. Das Fehlen acetoklastischer Methanbildung kann nicht durch die Thermodynamik erklärt werden, sondern dürfte auf eine veränderte Zusammensetzung der methanogenen Population zurückzuführen sein.

Die Ergebnisse der T-RFLP-Analyse bei 37°C waren ähnlich wie schon vorher beschrieben (Kapitel 1; Chin *et al.*, 1999a; Lueders und Friedrich, 2000). Die Abundanz von Rice Cluster I stieg mit zunehmender Inkubationstemperatur dramatisch an und gleichzeitig verschob sich der Anteil von H_2/CO_2 an der Methanbildung von ca. 35% bei 37°C (Kapitel 1) auf ca. 100% bei 50°C. Anscheinend waren Methanogene des Rice Cluster I für die thermophile Methanogenese verantwortlich und nutzten H_2/CO_2 als Substrat. Diese Schlußfolgerung deckt sich mit der Beobachtung, dass Methan aus Reiswurzeln, wo Methanogene des Rice Cluster I gefunden wurden (Großkopf *et al.*, 1998b), vorwiegend aus H_2/CO_2 gebildet wird (Lehmann-Richter *et al.*, 1999).

Die Herkunft thermophiler Methanogener und fermentierender Bakterien in psychrophilen und mesophilen Habitaten ist unklar. Eine Möglichkeit ist der Eintrag von Bakterien über die Luft aus vulkanischen, geothermischen oder hydrothermischen Habitaten (Bonjour *et al.*, 1988). Vorobyova *et al.* (1997) fanden hohe Zahlen lebender Mikroorganismen im Permafrost, darunter auch thermophile. Thermophile können oft lange Zeit überleben, ohne aktiv zu sein (Stetter, 1996). Die Existenz thermophiler Methanogener in der vorliegenden Arbeit könnte durch diese Fähigkeit erklärt werden. Auf der anderen Seite haben einige Thermophile eine sehr große Temperaturspanne und sind deshalb in der Lage bei mesophilen Temperaturen zu wachsen (Wiegel, 1990). Das T_{\min} Thermophiler liegt normalerweise 15-25°C unterhalb ihres T_{opt} (Kristjansson und Stetter, 1992). Demnach könnten die thermophilen Methanogenen in italienischem Reisfeldboden gerade noch in der Lage sein, bei $\geq 30^{\circ}\text{C}$ zu wachsen, was schon nahe an den höchsten *in situ*-Temperaturen in italienischem Reisfeldboden ist (Schütz *et al.* 1990). Für *Methanobacterium thermoautotrophicum* konnte sogar eine noch größere Temperaturspanne von bis zu 55°C beobachtet werden (22-78°C; Wiegel, 1990) und es wird vermutet, dass *M. thermoautotrophicum* deshalb in mesophilen Habitaten so weit verbreitet ist (Zeikus, 1979; Aragno, 1981). Eine große Temperaturspanne wurde auch bei anderen Mikroorganismen beobachtet (Wiegel, 1990). Die bisher unkultivierten Methanogenen des Rice Cluster I scheinen über die relativ große Temperaturspanne von 10 bis 37°C einen hohen Anteil an der gesamten methanogenen Population in italienischem Reisfeldboden zu haben (siehe Kapitel 1.6). Hier konnte gezeigt werden, dass diese Methanogenen bei 50°C sogar dominant sind. Es ist wahrscheinlich, dass psychrophile, mesophile und thermophile Populationen von Methanogenen des Rice Cluster I in Reisfeldboden existieren. Über die physiologischen Eigenschaften der individuellen Populationen von Rice Cluster I wird erst mehr bekannt werden, wenn die ersten Isolate vorliegen.

3 Einfluss der Temperatur auf methanogene Abbauprozesse – Suche nach dem limitierenden Schritt

Bisher gibt es kaum Untersuchungen über den Einfluss der Temperatur auf die einzelnen Prozesse des methanogenen Abbaus. Es wurde zwar der Umsatz einzelner Substrate im Reisfeldboden untersucht, wie beispielsweise von Glucose oder Propionat (Krylova *et al.* 1997, 1998; Chidthaisong *et al.*, 1999b). Auf die Beteiligung einzelner Substrate am Abbau wurde aus deren Akkumulation nach Hemmung der Methanogenese oder der syntrophen H₂-produzierenden Prozesse geschlossen. Auf den Effekt der Temperatur auf fermentative oder syntrophe Prozesse wurde durch kurzfristige Temperaturshifts geschlossen (Chin und Conrad, 1995). Über die Rate der Hydrolyse in Reisfeldboden ist bisher nichts bekannt, genauso wie über den Einfluss der Temperatur auf die am methanogenen Abbau beteiligten Prozesse unter Steady-State-Bedingungen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden erstmals die Raten der Hydrolyse von Polysacchariden und der Umsatz mehrerer direkter und indirekter methanogener Substrate bestimmt. Die Raten dieser Prozesse wurden sowohl als potentielle Raten unter einem Substratüberschuss als auch als aktuelle Raten unter *in situ*-Substratkonzentrationen bestimmt. Ziel dabei war es, den Einfluss der Temperatur auf die einzelnen Schritte des anaeroben Abbaus zu identifizieren. Gleichzeitig sollte untersucht werden, ob es einen limitierenden Schritt im methanogenen Abbau gibt. Dazu wurden die Rate der Hydrolyse von Zellulose, der Umsatz von Glucose und Propionat und die Rate der Methanbildung aus Acetat und H₂ bestimmt.

3.1 Potentielle und aktuelle Hydrolyse

Die Hydrolyse wird allgemein als der limitierende Schritt des Abbaus angesehen (Degens und Mopper, 1975; Billen, 1982; Meyer-Reil, 1983, 1984; Hoppe, 1983; King, 1986). Nach den Untersuchungen von Arnosti *et al.* (1998) scheint die Hydrolyse in kalten marinen Sedimenten jedoch nicht limitierend zu sein. Zellulose ist das wichtigste Polysaccharid in terrestrischen Ökosystemen (Watanabe *et al.* 1993; Vlasenko *et al.*, 1997). Glucose hat einen Anteil von mehr als 50% an den Monosacchariden in Reisfeldboden und Acetat wird in diesem Ökosystem zu mehr als 50% aus Glucose gebildet (Chidthaisong *et al.*, 1999b). Deshalb wurde stellvertretend die Hydrolyse von

Zellulose über Cellobiose zu Glucose in Abhängigkeit von der Temperatur als Initialschritt des anaeroben Abbaus untersucht. Dazu wurde die potentielle Aktivität der Exo- β -D-Glucanase, die Cellobiose vom Strangende der Zellulose abspaltet, und der β -D-Glucosidase, die Cellobiose in 2 Glucose spaltet, bestimmt. Die Aktivität beider Enzyme wurden über Zugabe der MUF-markierten Substrate MUF_{Glu} und MUF_{Cel} bestimmt. Die Bestimmung der potentiellen Endo-Glucanase-Aktivität, die die Zellulosestränge in kürzere Abschnitte schneidet, ist nur über den Einsatz komplexer künstlicher Substrate, wie beispielsweise Remazol-Brilliant-Blue (Wood und Kellogg, 1988), möglich. Die aktuelle Hydrolyseaktivität wurde hingegen über die Akkumulation von Glucose nach Hemmung der Glucose-Aufnahme bestimmt und erfasst damit die Summe der Hydrolyse-Aktivität.

Die MUF-Freisetzung aus MUF_{Glu} war bei allen Temperaturen deutlich höher als aus MUF_{Cel} (Abb. 6). Dies könnte auf die weitere Verbreitung von Glucosidasen durch ihre geringere Spezifität im Vergleich zu Glucanasen zurückzuführen sein (Desphande *et al.*, 1984, 1988). Im Boden eines Feuchtgebiets wurde eine potentielle β -Glucosidase-Aktivität von 0,028-0,065 $\mu\text{mol g}^{-1} \text{min}^{-1}$ gemessen, was 1,7-3,9 $\mu\text{mol g}^{-1} \text{h}^{-1}$ entspricht (Kang *et al.*, 1998). Diese Werte liegen um das zehnfache höher als die in Reisfeldboden gemessenen Werte (Abb. 6). Die relativ geringe potentielle Enzymaktivität könnte darauf zurückzuführen sein, dass nach der langen Inkubationszeit von 60 bis 90 Tagen bis zum Erreichen des Steady-State ohne Zufuhr von Substrat ein Großteil der leichtverfügbaren organischen Substanz bereits verwertet war. Möglicherweise waren nur noch relativ wenig extrazelluläre hydrolytische Enzyme vorhanden. Die Induktion von Enzymen kann innerhalb von Minuten erfolgen (Gottschalk, 1986), so dass bei der Bestimmung der potentiellen Enzymaktivität oft nicht zwischen konstitutiven (vorhandenen) und induzierbaren Enzymen unterschieden werden kann (Arnosti *et al.*, 1998). Der Einfluss einer Enzyminduktion auf die gemessene potentielle Enzymaktivität konnte aber weitgehend dadurch ausgeschlossen werden, dass der Versuch mit Inkubationszeiten von 15 min (MUF_{Glu}) bzw. 90 min (MUF_{Cel}) durchgeführt wurde. Diese lagen in dem im Vorversuch ermittelten linearen Bereich, so dass eine Enzyminduktion ausgeschlossen werden konnte, da dies zu einem nicht-linearen Verlauf der Enzymaktivität geführt hätte.

Bei 37°C wurde die Glucanase-Aktivität durch Gluconolacton (GLN) um fast 50% verringert. Das heißt, Glucosidasen trugen im Versuch ohne GLN zu fast 50% zur Spaltung von MUF_{cel} bei. Boschker und Cappenberg (1994) fanden sogar einen Anteil von

65%. Mit abnehmender Inkubationstemperatur nahm dieser Anteil jedoch ab. Dies bedeutet umgekehrt, dass Glucosidasen bei höherer Temperatur offensichtlich eine erhöhte unspezifische Aktivität haben und deshalb vermehrt MUF_{Cel} spalten. Dieses Ergebnis relativiert die erhöhte Temperaturempfindlichkeit der Glucanase-Aktivität bei der Bestimmung ohne GLN gegenüber der Glucosidase-Aktivität. Als Glucanase-Aktivität wird deshalb im Folgenden $MUF_{Cel} + GLN$ angesehen.

Die Glucanase-Aktivität war gegenüber der Glucosidase-Aktivität etwas temperaturempfindlicher, was aus der Aktivierungsenergie von 38 gegenüber 16 kJ mol^{-1} hervorgeht. Im Gegensatz dazu ergab die Bestimmung der Zellulase-Aktivität in einem Torfmoor einen sehr starken Anstieg der Aktivität mit ansteigender Temperatur (Nizovtseva *et al.*, 1994). Die Aktivierungsenergie der aktuellen Hydrolyse, die über die Glucose-Bildung als Summenparameter der Zellulasen bestimmt wurde, lag mit 29 kJ mol^{-1} zwischen den Aktivierungsenergien der Glucosidase und der Glucanase. Die deutlich geringere Rate der aktuellen Hydrolyseaktivität gegenüber der potentiellen Aktivität bei fast gleich geringer Temperaturabhängigkeit zeigt, dass die Hydrolyse im gesamten Temperaturbereich 10 bis 37°C durch die Substratverfügbarkeit limitiert war. Die Hydrolyse an sich stellt demnach nicht den limitierenden Schritt des anaeroben Abbaus dar, sie wird vielmehr durch die Verfügbarkeit hydrolysierbarer organischer Substrate limitiert. Chidthaisong *et al.* (1999a) konnten nach Düngung von Reisfeldboden mit komplexen Substraten (Kuhdung, Stroh) eine erhöhte Methan-Emission und einen erhöhten Acetat-Umsatz feststellen. Auch hier lag demnach eine Substratlimitierung der Hydrolyse vor. Zu gleichen Ergebnissen kamen Untersuchungen mariner Sedimente (Meyer-Reil, 1987; Arnosti *et al.*, 1998). Beim Vergleich der aktuellen und der potentiellen Hydrolyse darf nicht vergessen werden, dass die aktuelle Hydrolyse die Verwertung tatsächlich vorhandener Polymere wiedergibt, während die Bestimmung der potentiellen Hydrolyse über den Umsatz künstlicher Oligomere (MUF_{Glu} , MUF_{Cel}) möglicherweise zu einer deutlichen Überschätzung führt, da ein enzymatischer Angriff auf ein komplexes Polymer deutlich erschwert ist.

Die gemessene aktuelle Hydrolyseaktivität war mit maximal 12 $\text{nmol g}^{-1} \text{TB h}^{-1}$ um Faktor 10 geringer als im Versuch von Boschker *et al.* (1995). Allerdings dürfte unter Steady-State-Bedingungen nur noch wenig leicht verfügbarer Kohlenstoff vorhanden sein. Der Grund für die geringe Enzymaktivität ist demnach eine Substratlimitierung (siehe oben). Die Xylose-Akkumulation war im Versuch von Boschker *et al.* (1995) um Faktor 10 geringer als die Glucose-Akkumulation. Nimmt man für die Versuche der vorliegenden

Arbeit ein ähnliches Verhältnis an, erklärt sich aus der relativ hohen Nachweisgrenze der HPLC-Analyse (ca. 10 μM) dass keine Xylose gefunden wurde. Die im Vergleich zu Zellulose leichtere Abbaubarkeit von Hemizellulosen, deren Hauptbestandteil Xylose ist, ist ein weiterer Hinweis, dass Xylose unter Steady-State-Bedingungen nicht unbedingt zu erwarten ist.

Hoppe (1983) fand bei der Inkubation von Sedimentaufschlammungen bei 4°C und 20°C zu Inkubationsbeginn nur eine geringfügig höhere potentielle β -Glucosidase-Aktivität bei 20°C gegenüber 4°C, also eine geringe Temperaturempfindlichkeit. Ein drastischer Anstieg der Aktivität bei 20°C nach verlängerter Inkubation wurde als Enzym-Induktion aufgrund höherer mikrobieller Aktivität gedeutet. Als Grund für die geringe Temperaturabhängigkeit sowohl der potentiellen als auch der aktuellen Hydrolyseaktivität in der vorliegenden Arbeit bieten sich zwei mögliche Erklärungen an. Reichardt (1988) vermutete, dass eine temperaturbedingte Verringerung der Enzymaktivität in kalten Habitaten durch eine erhöhte Enzymproduktion ausgeglichen wird. Als Hinweis dafür konnte die Bestimmung der potentiellen Glucosidase-Aktivität zeigen, dass bei 10°C vorinkubierte Proben bei der Durchführung des Enzymtests unter verschiedenen Inkubationstemperaturen immer eine gleich hohe oder höhere potentielle Glucosidase-Aktivität haben als bei 37°C vorinkubierte Proben (Abb. 7). Bei 10°C wurden also tatsächlich größere Enzym-Mengen freigesetzt, die bei plötzlich höheren Temperaturen auch ihre Aktivität erhöhten. Andererseits könnte sich diese teilweise sogar erhöhte Aktivität der bei niedrigerer Temperatur inkubierten Proben auf einen geringen Temperatureffekt auf die Effizienz der Enzyme zurückführen lassen. Eine Erklärung wäre eine Bildung anderer Enzyme mit niedrigerem Temperaturoptimum. Als Hinweis darauf konnte gezeigt werden, dass das Temperaturoptimum der 10°C-Proben anscheinend bei ca. 25°C und damit unterhalb des Optimums der 37°C-Proben lag.

3.2 Umsatz direkter und indirekter methanogener Substrate

3.2.1 Umsatz von Glucose

Chidthaisong *et al.* (1999b) konnten zeigen, dass Glucose einen Anteil von >50% an den Monosacchariden im Reisfeldboden hat und dass unter Steady-State-Bedingungen 56% des umgesetzten Acetats über Glucose gebildet wird. Demnach scheint Glucose eines der

wichtigsten organischen Substrate in Reisfeldboden zu sein. Deshalb sollte zunächst der Umsatz von Glucose untersucht werden.

Die Methanbildung beim anaeroben Umsatz von Glucose im Überschuss verlief in zwei Phasen (Abb. 11). In Phase I erfolgte eine Stimulation der Methanbildung in etwa der gleichen Größenordnung wie unter einer Gasphase aus H_2 . Da Acetat in dieser ersten Phase noch akkumulierte, der H_2 -Partialdruck aber schon nach kurzer Zeit wieder abnahm, erfolgte die Methanbildung in dieser Phase offensichtlich zunächst aus H_2/CO_2 . Dafür spricht auch, dass die Stimulation der Methanbildung über den Temperaturbereich gleich verlief und auch nur geringfügig höher war als unter einem Überschuss an H_2 (Abb. 18). Die Phase II der Methanbildung setzte bei Temperaturen $>10^\circ C$ ein, nachdem der H_2 -Partialdruck auf Werte zwischen 1-5 Pa zurückgegangen und die CO_2 -Akkumulation nur noch sehr gering war (Abb. 11). Bei $10^\circ C$ konnten diese 2 Phasen aufgrund der sehr geringen Aktivität und der offensichtlich zu kurzen Inkubationszeit nicht beobachtet werden (Abb. 10). Die Methanproduktionsrate war in der zweiten Phase etwa so hoch wie die Summe der Raten nach Acetat-Zugabe und mit H_2 als Gasphase (Abb. 18). Die Methanbildung erfolgte in dieser Phase offensichtlich aus H_2/CO_2 und Acetat. Das bis zum Ende der ersten Phase auf bis zu 12 mM akkumulierte Acetat wurde in dieser zweiten Phase verwertet und gleichzeitig das weiterhin gebildete H_2 sofort zu Methan umgesetzt.

Metabolite der Glucose-Verwertung waren neben CH_4 , CO_2 und H_2 auch Acetat, Butyrat und in geringem Maße Propionat (Abb. 10, 11). Die selben Produkte wurden auch in anaerob inkubierten Reiswurzeln bei Zugabe ^{14}C -markierter Glucose gefunden (Conrad und Klose, 2000). Bei 10 bis $25^\circ C$ kam es zudem zu einer transienten Formiat-Akkumulation (Abb. 10, 11). Formiat war mit maximal 10% am C-Fluss beteiligt (Tab. 10) und wird normalerweise nur bei hohen H_2 -Partialdrücken beobachtet (Chin und Conrad, 1995). Die Formiat-Bildung erfolgt wahrscheinlich durch die Reduktion von CO_2 durch Methanogene oder Homoacetogene (Peters *et al.*, 1999).

Butyrat war mit einem Anteil von 35 bis 40% am C-Fluss neben Acetat das wichtigste Intermediat der Glucose-Verwertung (Tab. 10). Auch die Zugabe von Stroh zu anaerob inkubiertem Reisfeldboden bewirkte direkt nach Inkubationsbeginn eine Akkumulation von Butyrat (Glissmann und Conrad, 2000). *Clostridium butyricum* ist beispielsweise in der Lage, bei der Fermentation von Glucose neben Acetat, CO_2 und H_2 auch Butyrat zu bilden (Schink, 1997). Chin *et al.* (1998) konnten bei der Kultivierung eines Xylan- und eines Pektin-verwertenden Stammes (RXyl1 und Rpec11) mit Glucose als Substrat eine

Bildung von Butyrat beobachten. Unter Steady-State-Bedingungen konnte weder nach Hemmung der Methanbildung mit BES oder Chloroform (Chin und Conrad, 1995; Glissmann und Conrad, 2000) noch nach Hemmung syntropher Prozesse unter einem Überschuss an H_2 (Abb. 15-17) eine Akkumulation von Butyrat festgestellt werden. Auch beim Umsatz von ^{14}C -markierter Glucose oder Zellulose konnte kein oder fast kein Butyrat nachgewiesen werden (Ergebnisse 3.4; King und Klug, 1982; Krumböck und Conrad, 1991; Chin und Conrad, 1995; Chidthaisong und Conrad, 2000a). Da auch die Zugabe von Acetat (Abb. 14) keinerlei Butyrat-Akkumulation bewirkte, wird Butyrat offensichtlich nur nach Zugabe von (Poly-) Sacchariden wie Glucose (Abb. 10, 11) oder Stroh (Glissmann und Conrad, 2000) gebildet. Beim Umsatz dieser Substrate kam es zu einer sehr starken Acetat-Akkumulation (Abb. 10, 11; Glissmann und Conrad, 2000) die als Hinweis auf eine Inhibierung des Butyrat-Umsatzes zu Acetat (Conrad, 1999) beim Abbau von Glucose gewertet werden kann. Eine weitere Erklärung wäre die Selektion von Butyrat-bildenden Fermentierern durch die hohe Substratkonzentration. Somit scheint Butyrat nur bei Versuchen mit einem Überschuss an Glucose oder anderen komplexen Substraten wie Stroh (Glissmann und Conrad, 2000), nicht aber unter *in situ*-Bedingungen eine wichtige Rolle zu spielen.

Glucose wird in Reisfeldboden über den Embden-Meyerhof-Weg (Glycolyse) fermentiert, wobei Acetat und CO_2 in einem molaren Verhältnis von 1:1 gebildet werden, bzw. 2:1 bezogen auf mol C (Krumböck und Conrad, 1991). Aus Tab. 10 wird jedoch ersichtlich, dass Acetat und CO_2 beim Umsatz von Glucose im Überschuss in einem Verhältnis von ca. 1:1 bezogen auf mol C gebildet wurden. Da Butyrat syntroph zu 2 Acetat und 2 H_2 umgesetzt wird (Schink, 1997), kann man beide Intermediate aufsummieren. Dies resultiert in einem Verhältnis Acetat + Butyrat gegenüber CO_2 von 2:1, bezogen auf mol C (Tab. 10; Abb. 12). Demnach könnte die Methanbildung auch nach Stimulation mit Glucose wie erwartet zu $> 2/3$ über Acetat laufen (siehe Kapitel 1; King und Klug, 1982; Conrad, 1999). Weiter zeigt sich dabei, dass bei abnehmender Inkubationstemperatur ein etwas höherer Anteil der Glucose-Verwertung über Acetat und Butyrat läuft (Abb. 12). Auch wenn die Verschiebung nicht so deutlich ausfällt wie in Kapitel 1.7 erwartet, könnte dies als Hinweis auf eine stärkere Beteiligung homoacetogener Verwertung von Monosacchariden bei niedriger Temperatur gewertet werden, die auch schon von Chin und Conrad (1995) postuliert wurde.

Propionat, das einzige weitere Intermediat das bis zu 5% am C-Fluss beteiligt war (Tab. 10), kann ebenfalls während der Glucose-Fermentation über den Zwischenschritt Lactat oder Ethanol gebildet werden (Krumböck und Conrad, 1991). In Reisfeldboden der Camargue akkumulierte Propionat nach Xylan-Zugabe (Joulian *et al.*, 1996) und in italienischem Reisfeldboden nach Zugabe von Xylan oder Pektin (Chin *et al.*, 1998). Zugabe von Cellulose führte jedoch in keiner der Studien zur Akkumulation von Propionat. Auch aus Reisfeldboden gewonnene Zellulose-abbauende Isolate produzierten nur sehr geringe Mengen Propionat (Chin *et al.*, 1998). Chidthaisong und Conrad (2000b) fanden bei Versuchen unter Steady-State-Bedingungen nur eine Bildung von Acetat, CO₂ und CH₄ aus U-¹⁴C-Zellulose in Reisfeldboden, jedoch keinerlei Propionat und schlossen daraus, dass Propionat kein Produkt des Celluloseabbaus ist. Krumböck und Conrad (1991) konnten zwar Propionat-Bildung aus ¹⁴C-Glucose nachweisen, sie betrug aber <10% der zugegebenen Radioaktivität. Es zeigt sich also, dass Propionat, obwohl offensichtlich ein wichtiges Intermediat in Reisfeldboden (Krylova *et al.*, 1997, 1998), beim Umsatz von Zellulose und Glucose wahrscheinlich eine eher geringe Rolle spielt. Die lineare Akkumulation von Propionat über die gesamte Inkubationszeit (Abb. 10, 11) spricht dafür, dass Propionat in konstant geringem Umfang gebildet wurde und damit kein Intermediat des Glucose-Umsatzes ist, der in einer sehr schnellen Akkumulation wie im Fall des Acetat resultiert hätte. Zur Anreicherung von Propionat kam es durch die thermodynamische Hemmung des syntrophen Propionat-Umsatzes durch die Akkumulation von H₂ und Acetat (Krylova und Conrad, 1998). Aus U-¹⁴C-Glucose wurde andererseits zumindest in geringem Umfang Propionat gebildet.

Die Endprodukte des Glucose-Abbaus bestanden zu mehr als 2/3 aus CO₂ (Tab. 10). Im Gegensatz dazu wurde in einer früheren Studie Zellulose in Reisfeldboden zu gleichen Anteilen zu CH₄ und CO₂ umgesetzt (Chidthaisong und Conrad, 2000b). Genau dieses Verhältnis wäre auch unter der Annahme eines stöchiometrischen Abbaus von Glucose zu erwarten (Krumböck und Conrad, 1991). Ein möglicher Grund für die geringe Methanproduktion im Verhältnis zur CO₂-Bildung könnte die relativ kurze Inkubationszeit gewesen sein, so dass innerhalb dieser Zeit noch relativ wenig Methan gebildet wurde. Aus den Abb. 10 und 11 sowie Tab. 10 ist ersichtlich, dass die Methanbildung erst später einsetzte als die CO₂-Bildung, so dass bei 10 bis 20°C zum Inkubationsende noch kein Gleichgewicht erreicht war. Bei 25 bis 37°C zeigte sich jedoch, dass die Methan- und CO₂-Bildung schon fast ausgeglichen waren (Tab. 10).

Die über Markierung mit U-¹⁴C-Glucose bestimmte *in situ*-Umsatzrate von Glucose war wesentlich geringer als die potentielle Umsatzrate (Tab. 16). Die Umsatzzeit war mit 0,7 bis 0,8 h länger als die in früheren Studien ermittelten <16 min (Krumböck und Conrad, 1991; Chidthaisong und Conrad, 2000a), die errechnete Umsatzrate war sogar um Faktor 100 geringer als in der Studie von Chidthaisong und Conrad (2000b). Diese deutlich kürzeren Umsatzzeiten wurden allerdings in Studien mit sehr kurz vorinkubierten Bodenaufschlammungen bestimmt. Unter Steady-State-Bedingungen dürfte dagegen leichtverfügbare organische Substrate weitgehend abgebaut sein. Zum anderen war die Glucose-Konzentration im Porenwasser mit $\leq 0,2 \mu\text{M}$ extrem gering und resultierte in der geringen Umsatzrate. Möglicherweise wird die Porenwasser-Konzentration von Glucose durch die sehr schnelle Aufnahme so gering gehalten, während die intrazelluläre Konzentration erheblich höher sein könnte (King und Klug, 1982). Hinweise dafür wurden im Experiment gefunden: Glucose – sowohl ¹⁴C-markiert als auch im Überschuss vorhandene – verschwand sehr schnell. Die Bildung von Intermediaten und insbesondere von CH₄ und CO₂ aus U-¹⁴C-Glucose erfolgte erst später (Ergebnisse 3.4). Auch nach Glucose-Zugabe war die Wiederfindung des Glucose-C zumindest bei 10 bis 25°C zunächst relativ gering und stieg erst nach einiger Zeit wieder an (Tab. 10). Das heißt, Glucose wurde zwar schnell aufgenommen, aber erst später verwertet, was die verspätete Bildung markierter Metabolite und Endprodukte erklärt.

3.2.2 Umsatz von Propionat

Propionat führte nur zu einer geringen Stimulation der Methanogenese (Abb. 18), was auf eine geringe Bedeutung als Intermediat des methanogenen Abbaus hindeuten könnte (s. Kapitel 3.2.1). Die Konzentration des zugegebenen Propionats war zwar mit 1,5 mM deutlich geringer als die der anderen zugegebenen Substrate, allerdings hatten weder höhere Konzentrationen im Vorversuch noch Versuche von Roy und Conrad (1999) mit 6,7 mM Propionat eine stärkere Stimulation der Methanbildung ergeben. Die Akkumulation von Propionat bei Inkubationstemperaturen >55°C, Temperaturen oberhalb der die Methanogenen nicht mehr aktiv waren (siehe Kapitel 2), zeigt dass Propionat, nach Acetat, H₂ und CO₂, eines der wichtigsten Intermediate des methanogenen Abbaus in Reisfeldboden sein könnte. Andererseits könnte es im thermophilen Bereich zu einem veränderten Abbauweg unter verstärkter Bildung von Propionat kommen.

Krylova *et al.* (1997) konnten Propionat durch den Nachweis von 10^7 Zellen anaerober Propionatoxidierer in MPN-Bestimmungen, die Propionat-Akkumulation nach Stroh-Zugabe und den raschen Umsatz von ^{14}C -markiertem Propionat als eines der wichtigsten Substrate in italienischem Reisfeldboden identifizieren. Dies trifft auch auf das Sediment des Bodensees zu (Rothfuss und Conrad, 1993a). Andererseits zeigte der Umsatz von $2\text{-}^{14}\text{C}$ -Propionat mit $1,7$ bzw. $2,4 \mu\text{M h}^{-1}$ (15 bzw. 30°C ; Tab. 15) eine deutlich geringere Umsatzrate als im Versuch von Krylova *et al.* (1997; $5,5 \mu\text{M h}^{-1}$) und damit eine geringe Beteiligung an der Gesamt-Methanproduktion (Tab. 16). Wahrscheinlich hat Propionat zu Beginn der Methanbildung eine relativ große Bedeutung, weil es im Zuge der Reduktion alternativer Elektronenakzeptoren (z. B. Fe III, Sulfat) von Sulfatreduzierern verwertet wird (Krylova *et al.*, 1997). Unter Steady-State-Bedingungen geht die Bedeutung von Propionat möglicherweise zurück.

Produkte des Propionat-Umsatzes waren wie erwartet Acetat, CO_2 und H_2 und letztlich CH_4 (Krylova und Conrad, 1998). Die Acetat-Akkumulation war jedoch außer bei 10°C sehr gering, das heißt, das freiwerdende Acetat wurde sofort weiter umgesetzt. Die Methan-Bildung setzte bei Substrat-Zugabe sofort ein, begann im ^{14}C -Versuch jedoch stark zeitverzögert nach 160 min (30°C) bzw. 240 min (15°C). Dies spricht dafür, dass freiwerdendes, akkumulierendes Acetat tatsächlich direkt verwertet wurde, dieses Acetat also die acetoklastische Methanogenese stimulierte. Der RI von $0,4$ bzw. $0,5$ (Tab. 15) spricht dafür, dass $2\text{-}^{14}\text{C}$ -Propionat randomisiert über den Succinat-Weg umgesetzt wird (Krylova *et al.*, 1997). Nach Zugabe von Propionat hingegen wurde im Vergleich zu CO_2 erheblich weniger Methan gebildet als erwartet (Tab. 11). Da keine größere Anhäufung von Acetat zu beobachten war, kann man davon ausgehen, dass das Acetat mehr oder weniger vollständig zu CH_4 und CO_2 umgesetzt wurde. H_2 und CO_2 hingegen wurden nicht quantitativ zu Methan umgesetzt. Aus der Elektronenbilanz (Tab. 13) geht hervor, dass nach Propionat-Zugabe ein Elektronenüberschuss bestand. Offensichtlich verschwand ein Teil des gebildeten H_2 , so dass die Reduktionsäquivalente zur CO_2 -Reduktion fehlten. Dies zeigte sich auch an der ausbleibenden H_2 -Akkumulation (Abb. 13). Huminsäuren können zwar als Quelle oder Senke von Elektronen wirken (Yao und Conrad, 2000), die sehr hohen Standardabweichungen in der Bilanz deuten jedoch an, dass die Bilanzierung gegen den Kontrollversuch bei einer so geringen Stimulation der Methan- und CO_2 -Bildung zu großen Fehlern führt.

3.2.3 Umsatz von Acetat

Im Überschuss zugegebenes Acetat wurde bei allen Temperaturen im Bereich 10 bis 37°C zu jeweils ca. 50% zu CH₄ und CO₂ umgesetzt (Tab. 12). Dies deckt sich mit dem RI von 0, der beim Umsatz von 2-¹⁴C-Acetat gefunden wurde (Tab. 15), der zeigt dass die Methylgruppe des Acetat auch unter *in situ*-Acetat-Konzentrationen vollständig reduktiv zu CH₄ und die Carboxylgruppe zu CO₂ umgesetzt wurde. In früheren Studien wurde beim Umsatz von 2-¹⁴C-Acetat zu Methan ein RI von ca. 0,2 beobachtet (Winfrey und Zeikus, 1979a,b; Lovley und Klug, 1982; Conrad und Schütz, 1988; Chidthaisong *et al.*, 2000a). Dies wird durch einen natürlichen Isotopenaustausch zwischen der Methyl- und der Carboxylgruppe erklärt. Ein solcher Isotopenaustausch konnte beim Umsatz von Acetat und von Formiat nachgewiesen werden (de Graaf *et al.*, 1996; de Graaf und Cappenberg, 1996). In diesem Versuch konnte ein solcher Isotopenaustausch nicht beobachtet werden, was aber möglicherweise auf die mit 180 min (30°C) bzw. 240 min (15°C) relativ kurze Inkubationszeit zurückzuführen ist, innerhalb der noch keine ¹⁴CO₂-Bildung messbar war. Insgesamt zeigte sich sowohl unter *in situ*-Acetat-Konzentration als auch unter Substratsättigung ein gleichmäßiger Umsatz des Acetats zu CH₄ und CO₂.

Beim Umsatz von im Überschuss vorhandenem Acetat kam es zu einer geringfügigen Akkumulation von Propionat (Abb. 14), die im Mittel 2,6% des Acetat-C ausmachte (Tab. 12). Bei 10-20°C handelte es sich um eine kontinuierliche Akkumulation, während die Propionat-Konzentration bei Temperaturen >20°C innerhalb des Inkubationszeitraums wieder abnahm. Daraus resultiert ein steigender Anteil am C-Fluss mit sinkender Inkubationstemperatur. Ein Einbau von Acetat-C in Propionat wurde auch von Conrad und Klose (1999b) beobachtet und wurde als reduktive Propionat-Bildung aus Acetat, CO₂ und H₂ erklärt, also eine Umkehrung der syntrophen Propionatoxidation (Krylova und Conrad, 1998).

Im Reisfeldboden wurde zugegebenes 2-¹⁴C-Acetat bei 30°C im Zeitraum von <1 h (Chidthaisong und Conrad, 2000a), 16 h (Krumböck und Conrad, 1991) und bis zu 10 Tagen (Schütz *et al.*, 1989) umgesetzt. Schnellere Umsetzung von <1 h in eutrophen Profundalsediment gefunden (Winfrey und Zeikus, 1979b). Chidthaisong und Conrad (2000a) wiesen in methanogenem Reisfeldboden bei Abwesenheit alternativer Elektronenakzeptoren eine Umsatzzeit von 5 h nach, die gut mit der hier gemessenen Umsatzzeit von 5,6 bei 15°C übereinstimmte (Tab. 15). Bei 15°C stimmte der ¹⁴C-Acetat-Umsatz ebenfalls sehr gut mit der Methanbildung der Kontrolle (ohne Substratzugabe)

überein (Tab. 16). Der Großteil des Methans scheint also wirklich über Acetat gebildet worden zu sein, wie auch die Versuche mit ^{14}C -Bicarbonat (Kapitel 1.4) vermuten ließen. Für Reisfeldboden scheint damit die Vermutung von Nozhevnikova *et al.* (1997) nicht zuzutreffen, dass die acetoklastische Methanogenese eines der „Bottlenecks“ des anaeroben Abbaus bei niedriger Temperatur ist. Bei 30°C wurde die Methanbildung aus ^{14}C -Acetat allerdings deutlich überschätzt (Tab. 16). Der ^{14}C -Acetat-Umsatz war auch deutlich schneller als im Versuch von Chidthaisong und Conrad (2000a). Bei diesem Versuch war aber weder die Wiederfindung mit nur 49% noch die Ratenbestimmung mit einem r^2 von nur 0,79 sonderlich gut (Tab. 15).

3.2.4 Umsatz von H_2

In einem anoxischen System, das sich im Steady-State befindet, wird H_2 quantitativ über den „Interspecies hydrogen transfer“ transferiert und der H_2 -Partialdruck wird niedrig gehalten, so dass es zu keiner messbaren Akkumulation von Intermediaten kommt (Winter und Zellner, 1990). Bei einem Überschuss an Substraten, insbesondere bei hohen H_2 -Partialdrücken akkumulieren hingegen Intermediate des anaeroben Abbaus, da syntrophe Prozesse thermodynamisch gehemmt sind (Bryant, 1979; Winter und Zellner, 1990; Rothfuss und Conrad, 1993a). Dieser Effekt lässt sich zunutze machen, um die Vorläufer der Methanogenese zu bestimmen und über eine Quantifizierung Aussagen über den Abbauweg zu bekommen. Eine Zugabe von H_2/CO_2 im Vorversuch führte offensichtlich zu einem Wachstum der methanogenen Population. Deshalb wurde die Gasphase der Proben gegen H_2 ausgetauscht, um die Effekte eines H_2 -Überschusses möglichst ohne Aufwuchs der mikrobiellen Population beobachten zu können.

Unter einem Überschuss von H_2 kam es bei allen Temperaturen zu einer Akkumulation von Acetat, Propionat, Formiat und Iso-Valerat und, außer bei 10°C , auch von Valerat (Abb. 15-17). Caproat, Lactat und Iso-Propanol konnten im Gegensatz zu Experimenten von Chin und Conrad (1995) nicht nachgewiesen werden. Letztere Studie wurde aber relativ kurz nach Inkubationsbeginn durchgeführt, spiegelt also nicht unbedingt die Verhältnisse im Steady-State wieder. Eine transiente Formiat-Akkumulation, die bei allen Temperaturen zu beobachten war, wurde bei Wachstum unter H_2/CO_2 in Reinkulturen von Methanogenen, Homoacetogenen und Sulfatreduzierern gefunden. Formiat tritt bei diesen Organismen als Intermediat der H_2 -Verwertung auf (Peters *et al.*, 1999). Bei hohen H_2 -Partialdrücken wurde auch in Reisfeldboden eine Formiat-Akkumulation beobachtet (Chin

und Conrad, 1995; Krylova und Conrad, 1998), die auf eine Reduktion von CO₂ durch Methanogene oder Homoacetogene zurückzuführen ist (Peters *et al.*, 1999).

Die relativ geringe, lineare Akkumulation von Propionat lässt sich wahrscheinlich auf die oben beschriebene Hemmung der syntrophen Prozesse aufgrund der hohen H₂-Konzentration zurückführen und zeigt, dass ein Teil des methanogenen Abbaus über Propionat läuft. Eine Quantifizierung dieses Anteils war jedoch nicht möglich, da ein Teil des Propionats ebenso wie ein Teil des gebildeten Acetat auf eine reduktive Bildung aus H₂/CO₂ zurückzuführen sein kann. In anaerob inkubierten Reiswurzeln wurde Acetat zu 32-39% und Propionat sogar zu 42-61% aus CO₂ gebildet (Conrad und Klose, 1999b). Auch Rothfuss und Conrad (1993a) vermuteten einen Einbau von CO₂ in Propionat. In Reinkultur war *Desulfobulbus propionicus* in der Lage Propionat reduktiv aus Acetat, CO₂ und H₂ zu bilden (Laanbroek *et al.*, 1982; Tasaki *et al.*, 1992). In natürlichen Systemen wurde diese reduktive Propionat-Bildung jedoch noch nie beobachtet (Conrad und Klose, 1999b). Auch eine homoacetogene Acetat-Bildung aus H₂/CO₂ ist unter *in situ*-Substratkonzentrationen thermodynamisch meist nicht möglich (s. Kapitel 1.7; Chin und Conrad, 1995; Roy *et al.*, 1997; Glissmann und Conrad, 2000). Die Bilanzierung des H₂-Versuchs nur aus CH₄ und CO₂ ergab eine etwas zu geringe Wiederfindung, während die C-Bilanz mit Einrechnung des Acetats zu einer zu hohen Wiederfindung führte (Tab. 13). Dies dürfte darauf zurückzuführen sein, dass ein Teil des akkumulierten Acetats aus fermentativen Prozessen stammte, ein Teil aber reduktiv aus H₂/CO₂ gebildet wurde.

Weiter wurde bei allen Temperaturen eine geringe Akkumulation von Valerat und Iso-Valerat beobachtet. Diese dürften weder aus der Reduktion von CO₂ noch aus der Saccharid-Fermentation stammen, da nach Glucose-Zugabe keine der beiden Verbindungen detektierbar war. Vielmehr handelte es sich wahrscheinlich um Produkte des Proteinabbaus, die aufgrund der Hemmung H₂-produzierender Prozesse durch den hohen H₂-Partialdruck akkumulieren (Rothfuss und Conrad, 1993a; Conrad und Klose, 2000). Iso-Valerat ist ein Produkt des anaeroben Leucin-Abbaus (McInerney, 1988 in Conrad und Klose 2000), während Valerat beim Abbau von 5-Amino-Valerat gebildet wird (Buckel *et al.*, 1994), das aus dem Abbau von Prolin, Arginin und Ornithin stammt (McInerney, 1988). Eine Hemmung des Leucin-Abbaus durch hohe H₂-Partialdrücke wurde von Örlygsson *et al.* (1994) beobachtet. Da der Abbau von Valerat H₂ freisetzt, ist auch dies unter Standardbedingungen ein endergoner Prozess (Conrad und Klose, 2000).

Die Akkumulation von Valerat und Iso-Valerat kann somit als ein Hinweis auf eine Beteiligung des Proteinabbaus am Gesamtumsatz im Reisfeldboden gewertet werden.

Daraus, dass nach Hemmung der syntrophen Prozesse durch die hohe H_2 -Konzentration fast ausschließlich Acetat akkumulierte, kann man zusammenfassend schließen, dass der methanogene Abbau fast ausschließlich über H_2 , CO_2 und Acetat läuft, wie von Schink (1997) für den Abbau unter H_2 -Limitierung postuliert.

3.3 Welcher Schritt ist limitierend für den methanogenen Abbau?

Abschließend sollte geklärt werden, welchen Effekt die Temperatur auf die einzelnen Schritte des methanogenen Abbaus hat, wie schnell diese Schritte relativ zueinander ablaufen und ob es einen temperaturabhängigen limitierenden Schritt – ein sogenanntes „Bottleneck“ – gibt.

3.3.1 Raten des methanogenen Abbaus

Der Vergleich der Raten sämtlicher Schritte des methanogenen Abbaus zeigte, dass die Hydrolyse von Cellobiose (Glucosidase-Aktivität) der weitaus schnellste Schritt des anaeroben Abbaus war (Abb. 6). Dieser Schritt wird jedoch limitiert durch die Cellobiose-Verfügbarkeit, so dass letztlich die Exo-Glucanase-Aktivität – also die Abspaltung von Cellobiose aus der Zellulose – bzw. sogar noch der Schritt davor – die zufällige Spaltung von Zellulose in kürzere Stränge durch Endo-Glucanasen, um sie für die Exo-Glucanasen verfügbar zu machen – der limitierende hydrolytische Schritt war. Die Endo-Glucanase-Aktivität konnte allerdings nicht gemessen werden (siehe Kapitel 3.1). Die aktuelle Hydrolyse-Aktivität (Abb. 8), die durch die Messung der Glucose-Freisetzung die Summe der Hydrolyse wiedergibt, dürfte demnach der beste Parameter sein, um die Hydrolyse mit den nachfolgenden Schritten des methanogenen Abbaus zu vergleichen. Es zeigte sich, dass die aktuelle Hydrolyserate erheblich größer war als die Umsatzrate ^{14}C -markierter Glucose (Tab. 15). Allerdings wird der Glucose-Pool bei der Messung im Porenwasser offensichtlich deutlich unterschätzt, da ein so dramatisch geringerer Glucose-Umsatz im Vergleich zur Hydrolyserate ohne Akkumulation von Glucose nicht erklärbar ist. Möglicherweise ist die intrazelluläre Glucose-Konzentration größer als die Konzentration im Porenwasser, so dass es zu einer Unterschätzung der „wahren“ Glucose-Konzentration im Habitat kommt (King und Klug, 1982).

Zu weiteren Vergleichen wurde die Glucose-Freisetzung aus der aktuellen Hydrolyse in potentielle Methan-Bildung umgerechnet. Dazu wurde davon ausgegangen, dass aus einem mol Glucose drei mol Methan gebildet werden (Conrad, 1996). Der Vergleich mit der Methanbildung ohne Zusatz von Substraten (Kontrolle) zeigt, dass diese bei allen Temperaturen deutlich geringer war, als die potentielle Methanbildung aus der aktuellen Hydrolyse (Abb. 18). Eine Freisetzung von Glucose oder von intrazellulären Enzymen durch die Toluol-Zugabe bei der Bestimmung der aktuellen Hydrolyserate kann weitgehend ausgeschlossen werden (Boschker *et al.*, 1995). Da die Aktivität aus der linearen Glucose-Akkumulation berechnet wurde, ist mit einer Überschätzung der Aktivität durch Glucose-Freisetzung nicht zu rechnen, zumal die Zuckerkonzentration im Cytoplasma durch die Phosphorylierung der Zucker bei der Passage der Zellmembran sehr gering ist (Saier, 1985). Möglicherweise wird ein Teil der freigesetzten Glucose assimiliert, so dass sie nicht mehr für die Methanbildung zur Verfügung steht und damit die theoretisch mögliche Methanbildung aus der Hydrolyse überschätzt wird. Unter Steady-State-Bedingungen kam es bei keiner Temperatur zu einer Akkumulation von Glucose (Tab. 15) oder von Intermediaten des fermentativen Abbaus (siehe Kapitel 1.1). Deshalb muss davon ausgegangen werden, dass die Saccharid-Nachlieferung aus der Hydrolyse bei allen Temperaturen limitierend war. Dies deckt sich mit der Vermutung, dass die Hydrolyse der limitierende Schritt des anaeroben Abbaus sei (Degens und Mopper, 1975; Billen, 1982; Hoppe, 1983; Meyer-Reil, 1983, 1984; King, 1986). Da die *in situ*-Hydrolyserate bei allen Temperaturen niedriger war als die potentielle Hydrolyserate, stellt entweder die Aktivität der Endo-Glucanase oder die Verfügbarkeit hydrolysierbarer organischer Substrate die eigentliche Limitierung dar.

Einen besseren Einblick sollte der Vergleich der theoretisch möglichen Methanbildung aus der *in situ*-Hydrolyserate mit der Methanbildung aus verschiedenen Substraten ergeben (Abb. 18). Es zeigte sich, dass die Stimulation mit Propionat bei keiner Temperatur zu einer Methanbildung führte, die größer als die potentielle Methanbildung aus der Hydrolyse war. Dies könnte bedeuten, dass Propionat im Gegensatz zu früheren Studien (Krylova *et al.*, 1997, 1998) zumindest unter den hier untersuchten Steady-State-Bedingungen keine große Rolle für die Methanogenese in Reisfeldboden spielt (siehe Kapitel 3.2.2). Die anderen Substrate führten zumindest bei Temperaturen ≥ 20 bzw. $\geq 25^\circ\text{C}$ zu einer Stimulation der Methanbildung über das aus der aktuellen Hydrolyse „vorhergesagte“ Niveau hinaus. Die potentielle Methan-Produktionsrate aus Acetat und

aus H_2 war bei $\leq 20^\circ C$ fast gleich, bei höheren Temperaturen wurde die Methan-Produktionsrate durch Acetat jedoch deutlich stärker stimuliert und überschritt die aus der Hydrolyse vorhergesagte Methan-Produktionsrate schon bei niedrigerer Temperatur (Abb. 18). Die acetoklastischen Methanogenen waren demnach bei $< 25^\circ C$ temperaturlimitiert, obwohl die potentielle Methanbildung aus Acetat bei $\geq 25^\circ C$ deutlich stimuliert werden konnte und obwohl der Anteil acetoklastischer Methanogenese bei niedriger Temperatur zunahm (siehe Kapitel 1.4). Glucose-Zugabe führte zu der stärksten Stimulation der Methanogenese. Die aus der Hydrolyse vorhergesagte Rate wurde schon ab $15^\circ C$ erreicht (Phase I) oder sogar überschritten (Phase II). In der ersten Phase zeigte sich, dass die Methanproduktionsrate aus Glucose bei niedrigen Temperaturen höher war als aus den direkten methanogenen Substraten H_2 und Acetat. Insgesamt schien das Methan aber vorwiegend aus H_2/CO_2 gebildet zu werden (siehe Kapitel 3.2.1). Im Gegensatz dazu stieg die aus Acetat- und H_2/CO_2 -Verbrauch resultierende Stimulation nach Glucose-Zugabe in Phase II (siehe Kapitel 3.2.1) linear mit der Temperatur an und die aus der Hydrolyse vorhergesagte Methanproduktion wurde schon bei $15^\circ C$ überschritten.

3.3.2 Vergleich des Temperatureinflusses

Um einen Eindruck von dem Effekt der Temperatur auf die einzelnen Schritte des anaeroben Abbaus zu bekommen und diese miteinander vergleichen zu können, wurden die Aktivierungsenergien der Methanbildung, der MUF-Freisetzung aus MUF_{Glu} und MUF_{Cel} und der Glucose-Freisetzung aus der Hydrolyse berechnet. Die Aktivierungsenergie der Methanbildung ohne Substratzugabe lag mit 45 kJ mol^{-1} (Tab. 14) in einem ähnlichen Bereich, wie auch in anderen Studien in Reisfeldboden unter Steady-State-Bedingungen ($48\text{-}65 \text{ kJ mol}^{-1}$; Yao und Conrad, 2000; Ergebnisse Kapitel 1) oder in Mikrokosmen aus Reisfeldboden ($41\text{-}85 \text{ kJ mol}^{-1}$; Schütz *et al.*, 1990) gefunden wurde. Die Bestimmung der Aktivierungsenergien der Methanemissionen verschiedener philippinischer und texanischer Reisfeldböden ergaben eine erheblich breitere Variation und tendenziell höhere Werte von insgesamt $47 - 114 \text{ kJ mol}^{-1}$ (Sass *et al.*, 1991; Wassmann *et al.*, 1998).

Bergman *et al.* (2000) konnten durch die Zugabe von Glucose, H_2/CO_2 und Stärke zu Moorboden eine Verringerung der Variabilität der Methanemissionen bewirken und die verbleibende Variabilität auf den Einfluss der Temperatur zurückführen. Sass *et al.* (1991) beobachteten nach Acetat-Zugabe einen verringerten Temperatureffekt auf die

Methanbildung. Im Gegensatz dazu resultierte die Zugabe von Substrat hier in einer Erhöhung der Aktivierungsenergie (Tab. 14). Dies bedeutet, dass der Temperatureinfluss auf die Methanbildung als Endprodukt fermentativer und methanogener Prozesse unter substratgesättigten Bedingungen erheblich größer war als unter substratlimitierten Bedingungen. Dies ist ein Hinweis darauf, dass höhere Temperaturen eher in einer Substratlimitierung der Methanogenese resultieren als niedrigere Temperaturen. Dabei konnte auch gezeigt werden, dass die Methanbildung aus komplexen Substraten (Glucose) etwa die gleiche Aktivierungsenergie aufweist, wie aus direkten methanogenen Substraten (Acetat, H₂; Tab. 14). Der Effekt der Temperatur auf den potentiellen Umsatz von direkten und indirekten methanogenen Substraten scheint also der gleiche zu sein. Daraus folgt, dass die Glucose-Fermentation nie limitierend war. Nur die Zugabe von Propionat, das unter Steady-State-Bedingungen scheinbar nur wenig zur Methanbildung beiträgt (s. Kapitel 3.2), bewirkte eine geringere Aktivierungsenergie als die anderen Substrate, was ein Hinweis auf die geringe Beteiligung der Propionat-Oxidation an den methanogenen Abbauprozessen ist.

Die Umsatzzeiten von ¹⁴C-markierter Glucose (Tab. 15) zeigten nur einen sehr geringen Temperatureffekt. Da auch der Abbau im Überschuss zugebener Glucose (Abb. 10, 11; Tab. 10) nur wenig temperaturbeeinflusst war, scheint der Glucose-Umsatz bei niedriger Temperatur nicht limitierend für die Methanbildung zu sein. Die Metabolite des Glucose-Umsatzes häuften sich jedoch bei niedriger Temperatur an, wurden also innerhalb des Inkubationszeitraums nicht verwertet (Abb. 10, 11; Tab. 10). Auch King und Klug (1982) konnten in Seesedimenten keine saisonale Änderung des Glucose-Umsatzes beobachten. Sie zeigten aber, dass die Bildung von Intermediaten und Methan aus Glucose viel langsamer ist als die Glucose-Aufnahme selbst. Gleichzeitig wies auch die Hydrolyse im Vergleich zur Methanbildung eine deutlich geringere Aktivierungsenergie auf, war also weniger temperaturabhängig als die methanogenen Prozesse und hatte eine höhere Rate (Kapitel 3.3.1). Der Temperatureinfluss auf den ¹⁴C-Propionat-Umsatz war etwas stärker ausgeprägt, der ¹⁴C-Acetat-Umsatz war sogar sehr stark temperaturabhängig (Tab. 15). Da die Methanbildung aus Glucose bei niedriger Temperatur nicht stimuliert werden konnte, Glucose aber trotzdem sehr schnell verwertet wurde, zeigt dies, dass der Umsatz von Acetat bei niedriger Temperatur limitierend war. Das heißt, die Methanbildung selbst ist bei niedrigen Temperaturen limitiert, nicht jedoch die Fermentation. Leider lassen sich die Umsatzraten von Acetat und Glucose nicht direkt vergleichen, weil der Glucose-Umsatz

durch den äußerst geringen Glucose-Pool offensichtlich bei weitem unterschätzt wurde (s. Kapitel 3.2.1).

Die große Differenz der Aktivierungsenergien bei der Berechnung über den Temperaturbereich 10-37°C bzw. 15-37°C (Tab. 14) nach Stimulation der Methanbildung mit Acetat, Glucose und H₂ zeigt, dass es zwischen 15 und 10°C offensichtlich zu einer Änderung der Abbauprozesse kam. Möglicherweise liegt 10°C sehr nahe am unteren Temperaturlimit der Methanogenese, so dass eine Stimulation der Methanbildung nicht mehr möglich war. Schon in Kapitel 1 zeigte sich dieser Sprung beispielsweise durch den rapiden Anstieg der Steady-State-Acetat-Konzentration zwischen 15 und 10°C (Kapitel 1.3) und die veränderten Isotopen-Werte (Kapitel 1.8). Deshalb erscheint es sinnvoll, in zukünftigen Studien die Änderungen der Substratverwertung, der Isotopie und der beteiligten mikrobiellen Gemeinschaft im Temperaturbereich 10 bis 15°C genauer zu untersuchen.

Zusammenfassend zeigt sich, dass die Methanbildung bei Temperaturen $\geq 20^\circ\text{C}$ tendenziell substratlimitiert war, da zusätzlich zugeführtes Substrat auch zu einer Erhöhung der Methanproduktion führte. Auch die Substrat-Nachlieferung durch fermentative Prozesse ließ sich, wie am Beispiel der Glucose-Fermentation gezeigt, stimulieren. Die Limitierung bei hoher Temperatur erfolgt demnach allein durch die Verfügbarkeit komplexer Substrate. Unter Steady-State-Bedingungen liegt demnach entweder ein Mangel an organischem Substrat vor, oder die Endo-Glucanase – deren Messung nicht möglich war – liefert nicht genügend Zellulose-Stränge aus der Lignozellulose nach. Bei Temperaturen $\leq 20^\circ\text{C}$ war die Methanbildung hingegen eher temperaturlimitiert, da auch eine Substratzufuhr nur sehr begrenzt zu einer Erhöhung der Methanbildung führte. Hier konnte gezeigt werden, dass tatsächlich die Methanbildung selbst und nicht die Substratnachlieferung aus der Fermentation (Glucose-Umsatz) limitiert war. Diese Schwellentemperatur von 20°C ist nicht eindeutig definiert, da die hydrogenotrophe Methanbildung stärker durch niedrige Temperaturen limitiert wurde, als die acetoklastische Methanbildung. Bei 10°C jedoch lag eine reine Temperaturlimitierung der Methanbildung vor, die sich nicht durch Zufuhr von Substrat aufheben ließ. Da unter Steady-State-Bedingungen weder eine Akkumulation von Glucose, noch von Intermediaten fermentativer Prozesse messbar war, muss davon ausgegangen werden, dass die Saccharid-Nachlieferung aus der Hydrolyse bei allen Temperaturen der limitierende Schritt des methanogenen Abbaus war.

4 Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit konnten einige Fragen zum Einfluss der Temperatur auf die Methanbildung, die methanogenen Abbauprozesse und die beteiligte mikrobielle methanogene Gemeinschaft beantwortet werden. Einige neue Fragen sind dabei aufgetreten, die Thema zukünftiger Versuche sein sollten:

1. Der Temperaturbereich 10 bis 15°C sollte näher untersucht werden, da es hier zu deutlichen Änderungen der Methanogenese (Anstieg der Acetat-Konzentration, erhöhter Anteil der acetoklastischen Methanogenese, Änderung der Isotopensignatur von CH₄, CO₂ und Acetat) kam.
2. Die Bestimmung des Umsatzes ¹⁴C-markierten Methanols und der Poolgröße von Methanol im Porenwasser bei 10°C könnten Aufschluss darüber geben, ob Methanol oder methylierte Verbindungen einen größeren Anteil an der Methanbildung in Reisfeldboden haben als bisher vermutet.
3. Die Isotopensignatur von CH₄, CO₂ und Acetat sollten über den Verlauf der Inkubation verfolgt werden, um die Ergebnisse der gemessenen δ¹³C-Werte zu verifizieren. Um den Einfluss einer intramolekularen Fraktionierung von Acetat auszuschalten, sollte die Isotopensignatur der Methylgruppe bestimmt werden.
4. Der Einfluss der homoacetogenen Glucose-Verwertung bei niedriger Temperatur sollte näher untersucht werden.
5. Nachdem die T-RFLP-Analyse eine Verschiebung der Population der Archaea mit der Temperatur ergab, sollte auch der Einfluss der Temperatur auf die Zusammensetzung der Bacteria untersucht werden.
6. Die verschiedenen Rice Cluster, insbesondere Rice Cluster I, sollten isoliert werden, um Informationen über die Physiologie dieser *Archaea* zu bekommen.

V. Literaturverzeichnis

- Achtnich, C., F. Bak und R. Conrad.** 1995. Competition for electron donors among nitrate reducers, ferric iron reducers, sulfate reducers, and methanogens in anoxic paddy soil. *Biol. Fertil. Soils* **19**:65-72.
- Aragno, M.** 1981. Responses of microorganisms to temperature. S. 339-369. In: O. L. Lange, P. S. Nobel, C. B. Osmand, und H. Ziegler (Hrsg.), *Encyclopedia of plant physiology*. Springer, Heidelberg.
- Arnosti, C., B. B. Jørgensen, J. Sagemann und B. Thamdrup.** 1998. Temperature dependence of microbial degradation of organic matter in marine sediments. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **165**:59-70.
- Asakawa, S. und K. Hayano.** 1995. Populations of methanogenic bacteria in paddy field soil under double cropping conditions (rice-wheat). *Biol. Fertil. Soils* **20**:113-117.
- Asakawa, S., M. Akagawamatsushita, H. Morii, Y. Koga und K. Hayano.** 1995. Characterization of *Methanosarcina mazei* TMA isolated from a paddy field. *Current Microbiol.* **31**:34-38.
- Asakawa, S., M. Akagawa-Matsushita, Y. Koga und K. Hayano.** 1998. Communities of methanogenic bacteria in paddy field soils with long-term application of organic matter. *Soil Biol. Biochem.* **30**:299-303.
- Aselmann, I. und P. J. Crutzen.** 1990. A global inventory of wetland distribution and seasonality, net primary productivity, and estimated methane emissions. In: A. F. Bouwman (Hrsg.), *Soils and the greenhouse effect*. Wiley.
- Avery Jr., G. B. und C. S. Martens.** 1999. Controls on the stable isotopic composition of biogenic methane produced in a tidal freshwater estuarine sediment. *Geochim. Cosmochim. Acta* **63**:1075-1082.
- Barns, S. M., R. E. Fundyga, M. W. Jeffries und N. R. Pace.** 1994. Remarkable archaeal diversity detected in a Yellowstone National Park hot spring environment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**:1609-1613.

- Bilek, R. S., S. C. Tyler, R. L. Sass und F. M. Fisher.** 1999. Differences in CH₄ oxidation and pathways of production between rice cultivars deduced from measurements of CH₄ flux and $\delta^{13}\text{C}$ of CH₄ and CO₂. *Global Biogeochem. Cycles* **13**:1029-1044.
- Billen, G.** 1982. Modelling the processes of organic matter degradation and nutrients recycling in sedimentary systems. S. 15-42. In: D. B. Nedwell und C. M. Brown (Hrsg.), *Sediment microbiology*. Academic Press, London.
- Blair, N. E. und W. D. Carter Jr.** 1992. The carbon isotope biogeochemistry of acetate from a methanogenic marine sediment. *Geochim. Cosmochim. Acta* **56**:1247-1258.
- Blair, N. E., S. E. Boehme und W. D. Carter Jr.** 1993. The carbon isotope biogeochemistry of methane production in anoxic sediments: 1. Field observations. S. 574-593. In: R. S. Oremland (Hrsg.), *Biogeochemistry of Global Change*. Chapman & Hall, New York.
- Bonjour, F., A. Graber und M. Aragno.** 1988. Isolation of *Bacillus schlegelii*, a thermophilic, hydrogen oxidizing, aerobic autotroph, from geothermal and nongeothermal environments. *Microb. Ecol.* **16**:331-337.
- Boschker, H. T. S. und T. E. Cappenberg.** 1994. A sensitive method using 4-Methylumbelliferyl- β -cellobiose as a substrate to measure (1,4)- β -glucanase activity in sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**:3592-3596.
- Boschker, H. T. S., S. A. Bertilsson, E. M. J. Dekkers und T. E. Cappenberg.** 1995. An inhibitor-based method to measure initial decomposition of naturally occurring polysaccharides in sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**:2186-2192.
- Botz, R., H. D. Pokojski, M. Schmitt und M. Thomm.** 1996. Carbon isotope fractionation during bacterial methanogenesis by CO₂ reduction. *Org. Geochem.* **25**:255-262.
- Bouwman, A. F.** 1990. Exchange of greenhouse gases between terrestrial ecosystems and the atmosphere. In: A. F. Bouwman (Hrsg.), *Soils and the greenhouse effect*. Wiley and Sons, Chichester.
- Brand, W. A.** 1996. High precision isotope ratio monitoring techniques in mass spectrometry. *J. Mass Spectrometry* **31**:225-235.

- Brock, T. D.** 1997. Biology of microorganisms. M.T. Madigan, Martinko, J.M., Parker, J. (Hrsg.), 8. Aufl., Prentice-Hall International, London.
- Brosius, J., M. L. Palmer, P. J. Kennedy und H. R. Noller.** 1978. Complete nucleotide sequence of a 16S ribosomal RNA gene from *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **75**:4801-4805.
- Bryant, M. P.** 1979. Microbial methane production – theoretical aspects. J. Anim. Sci. **48**:193-201.
- Buckel, W., P. H. Janssen, A. Schuhmann, U. Eikmanns, P. Messner, U. Sleytr und W. Liesack.** 1994. *Clostridium viride* sp. nov, a strictly anaerobic bacterium using 5-aminovalerate as growth substrate, previously assigned to *Clostridium aminovalericum*. Arch. Microbiol. **162**:387-394.
- Buckley, D. H., J. R. Graber und T. M. Schmidt.** 1998. Phylogenetic analysis of nonthermophilic members of the kingdom *Crenarchaeota* and their diversity and abundance in soils. Appl. Environ. Microbiol. **64**:4333-4339.
- Cassmann, K. G., S. Peng, D. C. Olk, J. K. Ladha, W. Reichardt, A. Dobermann und U. Singh.** 1999. Opportunities for increased nitrogen-use efficiency from improved resource management in irrigated rice systems. Field Crops Res. **56**:7-39.
- Chidthaisong, A. und I. Watanabe.** 1997. Changes in concentration and $\delta^{13}\text{C}$ values of soil-trapped CH_4 and CO_2 in flooded rice soil. Biol. Fertil. Soils **24**:70-75.
- Chidthaisong, A. und R. Conrad.** 2000a. Turnover of glucose and acetate coupled to reduction of nitrate, ferric iron and sulfate and to methanogenesis in anoxic rice field soil. FEMS Microbiol. Ecol. **31**:73-86.
- Chidthaisong, A. und R. Conrad.** 2000b. Pattern of non-methanogenic and methanogenic degradation of cellulose in anoxic rice field soil. FEMS Microbiol. Ecol. **31**:87-94.
- Chidthaisong, A., H. Obata und I. Watanabe.** 1999a. Methane formation and substrate utilisation in anaerobic rice soils as affected by fertilisation. Soil Biol. Biochem. **31**:135-143.
- Chidthaisong, A., B. Rosenstock und R. Conrad.** 1999b. Measurement of monosaccharides and conversion of glucose to acetate in anoxic rice field soil. Appl. Environ. Microbiol. **65**:2350-2355.

- Chin, K. J. und R. Conrad.** 1995. Intermediary metabolism in methanogenic paddy soil and the influence of temperature. *FEMS Microbiol. Ecol.* **18**:85-102.
- Chin, K. J., F. A. Rainey, P. H. Janssen und R. Conrad.** 1998. Methanogenic degradation of polysaccharides and the characterization of polysaccharolytic clostridia from anoxic rice field soil. *Syst. Appl. Microbiol.* **21**:185-200.
- Chin, K. J., T. Lukow und R. Conrad.** 1999a. Effect of temperature on structure and function of the methanogenic archaeal community in an anoxic rice field soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:2341-2349.
- Chin, K. J., T. Lukow, S. Stubner und R. Conrad.** 1999b. Structure and function of the methanogenic archaeal community in stable cellulose-degrading enrichment cultures at two different temperatures (15 and 30°C). *FEMS Microbiol. Ecol.* **30**:313-326.
- Colberg, P. J.** 1988. Anaerobic microbial degradation of cellulose, lignin, oligolignols, and nomoaromatic lignin derivatives. S. 333-372. In: A. J. B. Zehnder (Hrsg.), *Biology of Anaerobic Microorganisms*. Wiley, New York.
- Cole, C. V., C. Cerri, K. Minami, A. Mosier, N. Rosenberg, D. Sauerbeck, D. Dumanski, J. Duxbury, J. Freney, R. Gupta, O. Heinemeyer, T. Kolchugina, J. Lee, K. Paustian, D. Powlson, N. Sampson, H. Tiessen, M. Van Noordwijk und Q. Zhao.** 1996. Agricultural options for mitigation of greenhouse gas emissions. S. 745-771. In: R. T. Watson, M. C. Zinyowera und R. H. Moss (Hrsg.), *Climate Change 1995. Impacts, adaptations and mitigation of climate change: scientific-technical analyses*. Published for the Intergovernmental Panel on Climate Change. Cambridge University Press, Cambridge.
- Conrad, R.** 1993. Mechanisms controlling methane emission from wetland rice fields. S. 317-335. In: R.S. Oremland (Hrsg.), *The biogeochemistry of global change: radiative trace gases*. Chapman & Hall, New York.
- Conrad, R.** 1996. Anaerobic hydrogen metabolism in aquatic sediments. *Mitt. Internat. Verein. Limnol.* **25**:15-24.
- Conrad, R.** 1999. Contribution of hydrogen to methane production and control of hydrogen concentrations in methanogenic soils and sediments. *FEMS Microbiol. Ecol.* **28**:193-202.

- Conrad, R. und M. Klose.** 1999a. How specific is the inhibition by methyl fluoride of acetoclastic methanogenesis in anoxic rice field soil? *FEMS Microbiol. Ecol.* **30**:47-56.
- Conrad, R. und M. Klose.** 1999b. Anaerobic conversion of carbon dioxide to methane, acetate and propionate on washed rice roots. *FEMS Microbiol. Ecol.* **30**:147-155.
- Conrad, R. und M. Klose.** 2000. Selective inhibition of reactions involved in methanogenesis and fatty acid production on rice roots. *FEMS Microbiol. Ecol.* **34**:27-34.
- Conrad, R. und H. Schütz.** 1988. Methods of studying methanogenic activities in aquatic environments. S. 301-343. In: B. Austin (Hrsg.): *Methods in aquatic bacteriology.* Wiley, Chichester.
- Conrad, R. und B. Wetter.** 1990. Influence of temperature on energetics of hydrogen metabolism in homoacetogenic, methanogenic, and other anaerobic bacteria. *Arch. Microbiol.* **155**:94-98.
- Conrad, R., F. Bak, H. J. Seitz, B. Thebrath, H.-P. Mayer und H. Schütz.** 1989. Hydrogen turnover by psychrotrophic homoacetogenic and mesophilic bacteria in anoxic paddy soil and lake sediment. *FEMS Microbiol. Ecol.* **62**:285-294.
- Conrad, R., B. Schink und T. J. Phelps.** 1986. Thermodynamics of H₂-consuming and H₂-producing metabolic reactions in diverse methanogenic environments under in situ conditions. *FEMS Microbiol. Ecol.* **38**:353-360.
- Conrad, R., H. Schütz und M. Babel.** 1987. Temperature limitation of hydrogen turnover and methanogenesis in anoxic paddy soil. *FEMS Microbiol. Ecol.* **45**:281-289.
- Degens, E. T. und K. Mopper.** 1975. Early diagenesis of organic matter in marine salts. *Soil Sci.* **119**:65-72.
- DeGraaf, W. und T. E. Cappenberg.** 1996. Evidence for isotopic exchange during metabolism of stable- isotope-labeled formate in a methanogenic sediment. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:3535-3537.

- DeGraaf, W., P. Wellsbury, R. J. Parkes und T. E. Cappenberg.** 1996. Comparison of acetate turnover in methanogenic and sulfate-reducing sediments by radiolabeling and stable isotope labeling and by use of specific inhibitors: Evidence for isotopic exchange. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:772-777.
- Desphande, M. V., K.-E. Eriksson und L. G. Pettersson.** 1984. An assay for the selective determination of exo-1,4- β -glucanases in a mixture of cellulolytic enzymes. *Anal. Biochem.* **138**:481-487.
- Desphande, M. V., L. G. Pettersson und K.-E. Eriksson.** 1988. Selective assay for exo-1,4- β -glucanases. *Methods in Enzymol.* **160**:126-130.
- Drake, H. L.** 1994. *Acetogenesis*. Chapman & Hall, London.
- Ehhalt, D. H.** 1988. How has the atmospheric concentration of CH₄ changed? S. 25-32. In: F. S. Rowland und I. S. A. Isaksen (Hrsg.) *The changing atmosphere*. Wiley and Sons, Chichester.
- Elsgaard, L., M. F. Isaksen, B. B. Jørgensen, A. M. Alayse und H. W. Jannasch.** 1994a. Microbial sulfate reduction in deep-sea sediments at the Guaymas basin - hydrothermal vent area - influence of temperature and substrates. *Geochim. Cosmochim. Acta* **58**:3335-3343.
- Elsgaard, L., D. Prieur, G. M. Mukwaya und B. B. Jørgensen.** 1994b. Thermophilic sulfate reduction in hydrothermal sediment of Lake Tanganyika, East Africa. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**:1473-1480.
- Encyclopédie des gaz.** 1976. Elsevier, Amsterdam.
- FAO.** 1985. *Fertilizer Yearbook*. Vol. 35, FAO statistics series No. 71, FAO, Rome, Italy.
- Frenzel, P., U. Bosse und P. H. Janssen.** 1999. Rice roots and methanogenesis in a paddy soil: ferric iron as an alternative electron acceptor on the rooted soil. *Soil Biol. Biochem.* **31**:421-430.
- Games, L. M., J. M. Hayes und R. P. Gunsalus.** 1978. Methane-producing bacteria: natural fractionations of the stable carbon isotopes. *Geochim. Cosmochim. Acta* **42**:1295-1297.
- Gelwicks, J. T., J. B. Risatti und J. M. Hayes.** 1989. Carbon isotope effects associated with autotrophic acetogenesis. *Org. Geochem.* **14**:441-446.

- Gelwicks, J. T., J. B. Risatti und J. M. Hayes.** 1994. Carbon isotope effects associated with acetoclastic methanogenesis. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**:467-472.
- Glissmann, K. und R. Conrad.** 2000. Fermentation pattern of methanogenic degradation of rice straw in anoxic paddy soil. *FEMS Microbiol. Ecol.* **31**:117-126.
- Gottschalk, G.** 1986. *Bacterial metabolism*. 2. Aufl., Springer, New York.
- Großkopf, R., P. H. Janssen und W. Liesack.** 1998a. Diversity and structure of the methanogenic community in anoxic paddy soil microcosms as examined by cultivation and direct 16S rRNA gene sequence retrieval. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:960-969.
- Großkopf, R., S. Stubner und W. Liesack.** 1998b. Novel euryarchaeotal lineages detected on rice roots and in the anoxic bulk soil of flooded rice microcosms. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:4983-4989.
- Harder, J.** 1997. Species-independent maintenance energy and natural population sizes. *FEMS Microbiol. Ecol.* **23**:39-44.
- Hoehler, T. M., M. J. Alperin, D. B. Albert und C. S. Martens.** 1998. Thermodynamic control on hydrogen concentrations in anoxic sediments. *Geochim. Cosmochim. Acta* **62**:1745-1756.
- Holzappel-Pschorn, A. und W. Seiler.** 1986. Methane emission during a cultivation period from an Italian rice paddy. *J. Geophys. Res.* **91**:11803-11814.
- Hoppe, H.-G.** 1983. Significance of exoenzymatic activities in the ecology of brackish water: measurements by means of methylumbelliferyl-substrates. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **11**:299-308.
- Huser, B. A., K. Wuhrmann und A. J. B. Zehnder.** 1982. *Methanothrix soehngenii* gen. nov. sp. nov., a new acetotrophic non-hydrogen-oxidizing methane bacterium. *Arch. Microbiol.* **132**:1-9.
- IPCC.** 1990. *Climate Change. The IPCC Scientific Assessment.* J. T. Houghton, G. J. Jenkins, J. J. Ephraums (Hrsg.), University Press, Cambridge.
- IPCC.** 1995. *Climate Change 1994. Radiative forcing of climate change and an evaluation of the IPCC IS1992 emission scenarios.* J.T. Houghton, L. G. Meira Filho, J. Bruce, H. Lee, B. A. Callander, E. Haites, N. Harris, K. Maskell (Hrsg.), Cambridge University Press, Cambridge.

- IPCC.** 1996. Climate Change 1995. The science of climate change. J.T. Houghton, L. G. Meira Filho, B. A. Callander, N. Harris, A. Kattenberg, K. Maskell (Hrsg.), Cambridge University Press, Cambridge.
- IRRI.** 1991. World rice statistics 1990. International Rice Research Institute, Philippinen.
- Isaksen, M. F., F. Bak und B. B. Jørgensen.** 1994. Thermophilic sulfate-reducing bacteria in cold marine sediment. *FEMS Microbiol. Ecol.* **14**:1-8.
- Jeanthon, C.** 2000. Molecular ecology of hydrothermal vent microbial communities. *Ant. V. Leeuwenhoek* **77**:117-133.
- Jedrysek, M. O.** 1999. Spatial and temporal patterns in diurnal variations of carbon isotope ratios of early-diagenetic methane from freshwater sediments. *Chem. Geol.* **159**:241-262.
- Jetten, M. S. M., A. J. M. Stams und A. J. B. Zehnder.** 1990. Acetate threshold values and acetate activating enzymes in methanogenic bacteria. *FEMS Microbiol. Ecol.* **73**:339-344.
- Jetten, M. S. M., A. J. M. Stams und A. J. B. Zehnder.** 1992. Methanogenesis from acetate: a comparison of the acetate metabolism in *Methanotheroxobacter soehngenii* and *Methanosarcina* spp. *FEMS Microbiol. Rev.* **88**:181-198.
- Jørgensen B. B., M. F. Isaksen und H. W. Jannasch.** 1992. Bacterial sulfate reduction above 100 °C in deep-sea hydrothermal vent sediments. *Science* **258**:1756-1757.
- Joulian, C., B. Ollivier, H.-U. Neue und P. A. Roger.** 1996. Microbiological aspects of methane emission by a ricefield soil from the Camargue (France) .1. Methanogenesis and related microflora. *Eur. J. Soil Biol.* **32**:61-70.
- Joulian, C., B. Ollivier, B. K. C. Patel und P. A. Roger.** 1998. Phenotypic and phylogenetic characterization of dominant culturable methanogens isolated from ricefield soils. *FEMS Microbiol. Ecol.* **25**:135-145.
- Kang, H., C. Freeman und M. A. Lock.** 1998. Trace gas emissions from a North Wales fen - role of hydrochemistry and soil enzyme activity. *Water Air and Soil Pollution* **105**:107-116.

- Khalil, M. A. K., R. A. Rasmussen, M. J. Shearer, R. W. Dalluge, L. Ren und C.-H. Duan.** 1998. Factors affecting methane emissions from rice fields. *J. Geophys. Res.* **103 D19**:25219-25231.
- Kimura, M., T. Minoda und J. Murase.** 1993. Water-soluble organic materials in paddy soil ecosystem. *Soil Sci. Plant Nutr.* **39**:713-724.
- King, G. M.** 1986. Characterization of β -Glucosidase activity in intertidal marine sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **51**:373-380.
- King, G. M. und M. J. Klug.** 1982. Glucose metabolism in sediments of a eutrophic lake: tracer analysis of uptake and product formation. *Appl. Environ. Microbiol.* **44**:1308-1317.
- Kotsyurbenko, O. R., A. N. Nozhevnikova und G. A. Zavarzin.** 1993. Methanogenic degradation of organic matter by anaerobic bacteria at low temperature. *Chemosphere* **27**:1745-1761.
- Kotsyurbenko, O. R., A. N. Nozhevnikova, T. I. Soloviova und G. A. Zavarzin.** 1996. Methanogenesis at low temperatures by microflora of tundra wetland soil. *Ant. Leeuwenhoek* **69**:75-86.
- Kristjansson, J.K. und K. O. Stetter.** 1992 Thermophilic bacteria. S. 1-18. In: J. K. Kristjanssen (Hrsg.), *Thermophilic bacteria*. Boca Raton: CRC Press, Inc.
- Krumböck, M. und R. Conrad.** 1991. Metabolism of position labelled glucose in anoxic methanogenic paddy soil and lake sediment. *FEMS Microbiol. Ecol.* **85**:247-256.
- Krylova, N. I. und R. Conrad.** 1998. Thermodynamics of propionate degradation in methanogenic paddy soil. *FEMS Microbiol. Ecol.* **26**:281-288.
- Krylova, N. I., P. H. Janssen und R. Conrad.** 1997. Turnover of propionate in methanogenic paddy soil. *FEMS Microbiol. Ecol.* **23**:107-117.
- Krzycki, J. A., W. R. Kenealy, M. J. DeNiro und J. G. Zeikus.** 1987. Stable carbon isotope fractionation by *Methanosarcina barkeri* during methanogenesis from acetate, methanol, or carbon dioxide-hydrogen. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**:2597-2599.
- Kudo, Y., T. Nakajima, T. Miyaki und H. Oyaizu.** 1997. Methanogen flora of paddy soils in Japan. *FEMS Microbiol. Ecol.* **22**:39-48.

- Laanbroek, H. J., T. Abee und I. L. Voogd.** 1982. Alcohol conversions by *Desulfobulbus propionicus* Lindhorst in the presence and absence of sulfate and hydrogen. Arch. Microbiol. **133**:178-184.
- Lange, N.A.** 1979. Handbook of chemistry. McGraw-Hill, New York.
- Lehmann-Richter, S., R. Großkopf, W. Liesack, P. Frenzel und R. Conrad.** 1999. Methanogenic archaea and CO₂-dependent methanogenesis on washed rice roots. Environ. Microbiol. **1**:159-166.
- Lettinga G., S. Rebac, S. Parshina, A. Nozhevnikova, J. B. van Lier und A. J. M. Stams.** 1999 High-rate anaerobic treatment of wastewater at low temperatures. Appl. Environ. Microbiol. **65**:1696-1702.
- Liu, W.-T., T. L. Marsh, H. Cheng und L. J. Forney.** 1997. Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. Appl. Environ. Microbiol. **63**:4516-4522.
- Lovley, D. R. und M. J. Klug.** 1982. Intermediary metabolism of organic matter in the sediments of a eutrophic lake. Appl. Environ. Microbiol. **43**:552-560.
- Lovley, D. R. und S. Goodwin.** 1988. Hydrogen concentrations as an indicator of the predominant terminal electron-accepting reactions in aquatic sediments. Geochim. Cosmochim. Acta **52**:2993-3003.
- Lueders, T. und M. Friedrich.** 2000. Archaeal population dynamics during sequential reduction processes in rice field soil. Appl. Environ. Microbiol. **66**:2732-2742.
- Lueders, T., K. J. Chin, R. Conrad und M. Friedrich.** 2001. Molecular analyses of methyl-coenzyme M reductase α -subunit (*mcrA*) genes in rice field soil and enrichment cultures reveal the methanogenic phenotype of a novel archaeal lineage. Environ. Microbiol. **Im Druck.**
- Mayer, H. P. und R. Conrad.** 1990. Factors influencing the population of methanogenic bacteria and the initiation of methane production upon flooding of paddy soil. FEMS Microbiol. Ecol. **73**:103-112.
- McInerney, M. J.** 1988. Anaerobic hydrolysis and fermentation of fats and proteins. S. 373-415. In: A. J. B. Zehnder (Hrsg.), Biology of anarobic microorganisms.

- Meyer-Reil, L.-A.** 1983. Benthic response to sedimentation events during autumn to spring at a shallow water station in the Western ght. II. Analysis of benthic bacterial populations. *Mar. Biol.* **77**:247-256.
- Meyer-Reil, L.-A.** 1984. Seasonal variations in bacterial biomass and decomposition of particulate organic matter in marine sediments. *Arch. Hydrobiol. Beih.* **19**:201-206.
- Meyer-Reil, L.-A.** 1987. Seasonal and spatial distribution of extracellular enzymatic activities and microbial incorporation of dissolved organic substrates in marine sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**:1748-1755.
- Minami, K. und H.-U. Neue.** 1994. Rice paddies as a methane source. *Climatic Change* **27**:13-26.
- Nedwell, D. B.** 1999. Effect of low temperature on microbial growth: lowered affinity for substrates limits growth at low temperature. *FEMS Microbiol. Ecol.* **30**:101-111.
- Neue, H.-U. und P. A. Roger.** 1993. Rice agriculture: Factors controlling emissions. S. 254-298. In: M. A. K. Khalil (Hrsg.), *Atmospheric methane: sources, sinks and role in global change*. Springer, Berlin.
- Neue, H.-U., P. Becker-Heidmann, H. W. Scharpenseel.** 1990. Organic matter dynamics, soil properties, and cultural practices in rice lands and their relationship to methane production. In: A. F. Bouwman (Hrsg.), *Soils and the greenhouse effect*. Wiley and Sons, Chichester.
- Ng, T. K., P. J. Weimer und L. J. Gawel.** 1989. Possible nonanthropogenic origin of two methanogenic isolates from oil-producing wells in San Miquelito field, Ventura County, California. *Geomicrobiol. J.* **7**:185-192.
- Nizovtseva, D. V., A. M. Semenov und N. S. Panikow.** 1994. Cellulase activity in peat bog soil at different temperatures. *Microbiology* **63**:503-505.
- Nozhevnikova, A. N., C. Holliger, A. Ammann und A. J. B. Zehnder.** 1997. Methanogenesis in sediments from deep lakes at different temperatures (12-70°C). *Water Sci. Tech.* **36**:57-64.
- Nozhevnikova, A. N., O. R. Kotsyurbenko und M. V. Simankova.** 1994. Acetogenesis at low temperature. S. 416-431. In: H. L. Drake (Hrsg.), *Acetogenesis*. Chapman and Hall, London.

- Nüsslein, B. und R. Conrad.** 2000. Methane production in eutrophic lake Plußsee: seasonal change, temperature effect and metabolic processes in the profundal sediment. *Arch. Hydrobiol.* **149**:597-623:
- Ogram, A., G. S. Sayler und T. Barkay.** 1987. The extraction and purification of microbial DNA from sediments. *J. Microbiol. Methods* **7**:57-66.
- Örlygsson, J., F. P. Houwen und B. H. Svensson.** 1994. Influence of hydrogenotrophic methane formation on the thermophilic anaerobic degradation of protein and amino acids. *FEMS Microbiol. Ecol.* **13**:327-334.
- Orphan, V. J., L. T. Taylor, D. Hafenbradl und E. F. DeLong.** 2000 Culture-dependent and culture-independent characterization of microbial assemblages associated with high temperature petroleum reservoirs. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:700-711.
- Osborn, A. M., E. R. B. Moore und K. N. Timmis.** 2000. An evaluation of terminal-restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis for the study of microbial community structure and dynamics. *Environ. Microbiol.* **2**:39-50.
- Peters, V., P. H. Janssen und R. Conrad.** 1999. Transient production of formate during chemolithotrophic growth of anaerobic microorganisms on hydrogen. *Curr. Microbiol.* **38**:285-289.
- Rajagopal, B. S., N. Belay und L. Daniels.** 1988. Isolation and characterization of methanogenic bacteria from rice paddies. *FEMS Microbiol. Ecol.* **53**:153-158.
- Ramakrishnan, B., S. Kumaraswamy, K. Mallick, T. K. Adhya, V. R. Rao und N. Sethunathan.** 1998. Effect of various anionic species on net methane production in flooded rice soils. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **14**:743-749.
- Ramakrishnan, B., T. Lueders, R. Conrad und M. Friedrich.** 2000. Effect of soil aggregate size on methanogenesis and archaeal community structure in anoxic rice field soil. *FEMS Microbiol. Ecol.* **32**:261-270.
- Reichardt, W.** 1988. Impact of the Antarctic benthic fauna on the enrichment of biopolymer degrading psychrophilic bacteria. *Microb. Ecol.* **15**:311-321.
- Reichardt, W., G. Mascarina, B. Padre und J. Doll.** 1997. Microbial communities of continuously cropped, irrigated rice fields. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:233-238.

- Rothfuss, F. und R. Conrad.** 1993a. Thermodynamics of methanogenic intermediary metabolism in littoral sediment of lake Constance. *FEMS Microbiol. Ecol.* **12**:265-276.
- Rothfuss, F. und R. Conrad.** 1993b. Vertical profiles of CH₄ concentrations, dissolved substrates and processes involved in CH₄ production in a flooded Italian rice field. *Biogeochem.* **18**:137-152.
- Rowe, R., R. Todd und J. Waide.** 1977. Microtechnique for most-probable-number analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* **33**:675-680.
- Roy, R. und R. Conrad.** 1999. Effect of methanogenic precursors (acetate, hydrogen, propionate) on the suppression of methane production by nitrate in anoxic rice field soil. *FEMS Microbiol. Ecol.* **28**:49-61.
- Roy, R., H. D. Klüber und R. Conrad.** 1997. Early initiation of methane production in anoxic rice soil despite the presence of oxidants. *FEMS Microbiol. Ecol.* **24**:311-320.
- Rozanova, E. P., T. N. Nazina und A. S. Galushko.** 1988. Isolation of a new genus of sulfate-reducing bacteria and description of a new species of this genus, *Desulfomicrobium apsphaeronum* gen. nov., sp. nov. *Microbiology* **57**:514-520.
- Saier Jr., M. H.** 1985. Mechanisms and regulation of carbohydrate transport in bacteria. Academic Press, New York.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch und T. Maniatis** 1989. Molecular cloning, a laboratory manual. 2. Aufl. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Sass, R. L., F. M. Fisher, F. T. Turner und M. F. Jund.** 1991. Methane emission from rice fields as influenced by solar radiation, temperature, and straw incorporation. *Global Biogeochem. Cycles* **5**:335-350.
- Schink, B.** 1992. Syntrophism among prokaryotes. S. 276-299. In: A. Balows, H. G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder, K. H. Schleifer (Hrsg.), *The Prokaryotes*. Springer, New York.
- Schink, B.** 1997. Energetics of syntrophic cooperation in methanogenic degradation. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **61**:262-280.
- Schlegel, H. G.** 1992. *Allgemeine Mikrobiologie*. 7. Aufl., Thieme, Stuttgart.

- Schlichting, E., H.-P. Blume und K. Stahr.** 1995. *Bodenkundliches Praktikum*. 2. Aufl., Blackwell, Berlin.
- Schulz, S. und R. Conrad.** 1996. Influence of temperature on pathways to methane production in the permanently cold profundal sediment of Lake Constance. *FEMS Microbiol. Ecol.* **20**:1-14.
- Schulz, S., H. Matsuyama und R. Conrad.** 1997. Temperature dependence of methane production from different precursors in a profundal sediment (Lake Constance). *FEMS Microbiol. Ecol.* **22**:207-213.
- Schütz, H., W. Seiler und R. Conrad.** 1989. Processes involved in formation and emission of methane in rice paddies. *Biogeochem.* **7**:33-53.
- Schütz, H., W. Seiler und R. Conrad.** 1990. Influence of soil temperature on methane emission from rice paddy fields. *Biogeochem.* **11**:77-95.
- Seiler, W.** 1985. Increase of atmospheric methane: causes and impact on the environment. S. 177-203. In: World Meteorological Organisation (Hrsg.), WMO Special Environmental Report No. 16, WMO No. 647, Geneva.
- Sekiguchi, Y., Y. Kamagata, K. Sytsubo, A. Ohashi, H. Harada und K. Nakamura.** 1998. Phylogenetic diversity of mesophilic and thermophilic granular sludges determined by 16S rRNA gene analysis. *Microbiology - UK* **144**:2655-2665.
- Sievert, S. M., J. Kuever und G. Muyzer.** 2000. Identification of 16S ribosomal DNA-defined bacterial populations at a shallow submarine hydrothermal vent near Milos Island (Greece). *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:3102-3109.
- Skirnisdottir, S., G. O. Hreggvidsson, S. Hjörleifsdottir, V. T. Martinsson, S. K. Petursdottir, O. Holst und J. K. Kristjansson.** 2000. Influence of sulfide and temperature on species composition and community structure of hot spring microbial mats. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:2835-2841.
- Smalla, K., N. Cresswell, L. C. Mendonca-Hagler, A. Wolters und J. D. van Elsas.** 1993. Rapid DNA extraction protocol from soil for polymerase chain reaction-mediated amplification. *J. Appl. Bacteriol.* **74**:78-85.
- Somville, M. und G. Billen.** 1983. A method for determining exoprotoleolytic activity in natural waters. *Limnol. Oceanogr.* **28**:190-193.

- Stams, A. J. M.** 1994. Metabolic interactions between anaerobic bacteria in methanogenic environments. *Ant. V. Leeuwenhoek* **66**:271-294.
- Stams, A. J. M., J. B. Van Dijk, C. Dijkema und C. M. Plugge.** 1993. Growth of syntrophic ethanol-oxidizing bacteria with fumarate in the absence of methanogenic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**:1114-1119.
- Steele, L. P., E. J. Dlugokencky, P. M. Lang, P. P. Tans, R. C. Martin und K. A. Masarie.** 1992. Slowing down of the global accumulation of atmospheric methane during the 1980s. *Nature* **35**:313-316.
- Stetter, K. O.** 1996. Hyperthermophilic procaryotes. *FEMS Microbiol. Rev.* **18**:149-158.
- Stumm, W. und J. J. Morgan.** 1996. *Aquatic Chemistry*. 3rd edition. Wiley & Sons Inc.
- Sugimoto, A. und E. Wada.** 1993. Carbon isotopic composition of bacterial methane in a soil incubation experiment: contributions of acetate and CO₂/H₂. *Geochim. Cosmochim. Acta* **57**:4015-4027.
- Sugimoto, A., X. Hong und E. Wada.** 1991. Rapid and simple measurement of carbon isotope ratio of bubble methane using GC/C/IRMS. *Mass Spectros.* **39**:261-266.
- Summons, R. E., P. D. Franzmann und P. D. Nichols.** 1998. Carbon isotope fractionation associated with methylotrophic methanogenesis. *Org. Geochem.* **28**:465-475.
- Tasaki, M., Y. Kamagata, K. Nakamura und E. Mikami.** 1992. Propionate formation from alcohols or aldehydes by *Desulfobulbus propionicus* in the absence of sulfate. *J. Ferment. Bioeng.* **73**:329-331.
- Thauer, R. K., K. Jungermann und K. Decker.** 1977. Energy conservation in chemotrophic anaerobic bacteria. *Bact. Rev.* **41**:100-180.
- Thebrath, B.** 1991. *Bildung, Oxidation und Emission von Methan sowie anaerobe Stoffumsätze in limnischen Standorten*. Hartung-Gorre-Verlag. Konstanz.
- Thebrath, B., H.-P. Mayer und R. Conrad.** 1992. Bicarbonate-dependent production and methanogenic consumption of acetate in anoxic paddy soil. *FEMS Microbiol. Ecol.* **86**:295-302.

- Tijhuis, L., M. C. M. VanLoosdrecht und J. J. Heijnen.** 1993. A thermodynamically based correlation for maintenance Gibbs energy requirements in aerobic and anaerobic chemotrophic growth. *Biotechnol. Bioeng.* **42**:509-519.
- Ueki, A., K. Ono, A. Tsuchiya und K. Ueki.** 1997. Survival of methanogens in air-dried paddy field soil and their heat tolerance. *Water Sci. Tech.* **36**:517-522.
- VanBodegom, P. M. und A. J. M. Stams.** 1999. Effects of alternative electron acceptors and temperature on methanogenesis in rice paddy soils. *Chemosphere* **39**:167-182.
- VanHulzen, J. B., R. Segers, P. M. van Bodegom und P. A. Leffelaar.** 1999. Temperature effects on soil methane production: an explanation for observed variability. *Soil Biol. & Biochem.* **31**:1919-1929.
- VanLier, J. B., J. L. S. Martin und G. Lettinga.** 1996. Effect of temperature on the anaerobic thermophilic conversion of volatile fatty acids by dispersed and granular sludge. *Water Res.* **30**:199-207.
- Vlasenko, E. Y., H. Ding, J. M. Labavitch und S. P. Shoemaker.** 1997. Enzymatic hydrolysis of pretreated rice straw. *Biores. Technol.* **59**:109-119.
- Vorobyova, E., V. Soina, M. Gorlenko, N. Minkovakaya, N. Zalinova, A. Mamukelashvili, D. Gilichinsky, E. Rivkina und T. Vishnivetkaya.** 1997. The deep cold biosphere: facts and hypothesis. *FEMS Microbiol. Rev.* **20**:277-290.
- Wassmann, R., H.-U. Neue, C. Bueno, R. S. Lantin, M. C. R. Alberto, L. V. Buendia, K. Bronson, H. Papen und H. Rennenberg.** 1998. Methane production capacities of different rice soils derived from inherent and exogenous substrates. *Plant and Soil* **203**:227-237.
- Watanabe, A., K. Katoh und M. Kimura.** 1993. Effect of rice straw application of CH₄ emission from paddy fields. Contribution of organic constituents in rice straw. *Soil Sci. Plant Nutr.* **39**:707-712.
- Westermann, P.** 1994. The effect of incubation temperature on steady-state concentrations of hydrogen and volatile fatty acids during anaerobic degradation in slurries from wetland sediments. *FEMS Microbiol. Ecol.* **13**:295-302.
- Westermann, P.** 1996. Temperature regulation of anaerobic degradation of organic matter. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **12**:497-503.

- Westermann, P., B. K. Ahring und R. A. Mah.** 1989. Temperature compensation in *Methanosarcina barkeri* by modulation of hydrogen and acetate affinity. Appl. Environ. Microbiol. **55**:1262-1266.
- Whiticar, M. J.** 1999. Carbon and hydrogen isotope systematics of bacterial formation and oxidation of methane. Chem. Geol. **161**:291-314.
- Whiticar, M. J., E. Faber und M. Schoell.** 1986. Biogenic methane formation in marine and freshwater environments: CO₂ reduction vs. acetate fermentation - isotopic evidence. Geochim. Cosmochim. Acta **50**:693-709.
- Wiegel, J.** 1990. Temperature spans for growth: hypothesis and discussion. FEMS Microbiol. Rev. **75**:155-170.
- Winfrey, M. R. und J. G. Zeikus.** 1979a. Microbial methanogenesis and acetate metabolism in a meromictic lake. Appl. Environ. Microbiol. **37**:213-221.
- Winfrey, M. R. und J. G. Zeikus.** 1979b. Anaerobic metabolism of immediate methane precursors in Lake Mendota. Appl. Environ. Microbiol. **37**:244-253.
- Winter, J. und G. Zellner.** 1990. Thermophilic anaerobic degradation of carbohydrates – metabolic properties of microorganisms from the different phases. FEMS Microbiol. Rev. **75**:139-154.
- Wolin, E. A., M. J. Wolin und R. S. Wolfe.** 1963. Formation of methane by bacterial extracts. J. Biol. Chem. **238**:2882-2886.
- Wood, W. A. und S. T. Kellogg.** 1988. Biomass; Part A Cellulose and Hemicellulose. In: J. N. Abelson und M. I. Simon (Hrsg.), Methods in Enzymol. 160. Academic Press, San Diego.
- Yang, S.-S. und H.-L. Chang.** 1998. Effect of environmental conditions on methane production and emission from paddy soil. Agric. Ecosys. Environ. **69**:69-80.
- Yao, H. und R. Conrad.** 1999a. Thermodynamics of methane production in different rice paddy soils from China, the Philippines and Italy. Soil Biol. Biochem. **31**:463-473.
- Yao, H. und R. Conrad.** 1999b. Effect of soil characteristics on sequential reduction and methane production in sixteen rice paddy soils from China, the Philippines, and Italy. Biogeochem. **47**:269-295.

-
- Yao, H. und R. Conrad.** 2000a. Effect of temperature on reduction of iron and production of carbon dioxide and methane in anoxic wetland rice soils. *Biol. Fertil. Soils* **30**: 135-141.
- Yao, H. und R. Conrad.** 2000b. Electron balance during steady state production of CH₄ and CO₂ in anoxic rice soil. *Eur. J. Soil Sci.* **51**:369-378.
- Yao, H., R. Conrad, R. Wassmann und H.-U. Neue.** 1999. Effect of soil characteristics on sequential reduction and methane production in sixteen rice paddy soils from China, the Philippines, and Italy. *Biogeochem.* **47**:269-295.
- Zehnder, A. J. B.** 1978. Ecology of methane formation. S. 349-376 In: R. Mitchell (Hrsg.), *Water pollution microbiology*. Vol. 2, Wiley, New York.
- Zeikus J. G. und M. R. Winfrey.** 1976. Temperature limitation of methanogenesis in aquatic sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **31**:99-107.
- Zeikus, J. G.** 1979. Thermophilic bacteria: ecology, physiology and technology. *Enz. Microbiol. Tech.* **1**:243-252.
- Zinder, S. H.** 1993. Pysiological ecology of methanogens. S. 128-206. In: J. G. Ferry (Hrsg.), *Methanogenesis: ecology, physiology, biochemistry & genetics*. Chapman & Hall, New York, N.Y.

Anhang A

Effect of Temperature on Carbon and Electron Flow and on the Archaeal Community in Methanogenic Rice Field Soil

AXEL FEY AND RALF CONRAD*

Max-Planck-Institut für Terrestrische Mikrobiologie, D-35043 Marburg, Germany

Received 21 June 2000/Accepted 24 August 2000

Temperature is an important factor controlling CH₄ production in anoxic rice soils. Soil slurries, prepared from Italian rice field soil, were incubated anaerobically in the dark at six temperatures of between 10 to 37°C or in a temperature gradient block covering the same temperature range at intervals of 1°C. Methane production reached quasi-steady state after 60 to 90 days. Steady-state CH₄ production rates increased with temperature, with an apparent activation energy of 61 kJ mol⁻¹. Steady-state partial pressures of the methanogenic precursor H₂ also increased with increasing temperature from <0.5 to 3.5 Pa, so that the Gibbs free energy change of H₂ plus CO₂-dependent methanogenesis was kept at -20 to -25 kJ mol of CH₄⁻¹ over the whole temperature range. Steady-state concentrations of the methanogenic precursor acetate, on the other hand, increased with decreasing temperature from <5 to 50 μM. Simultaneously, the relative contribution of H₂ as methanogenic precursor decreased, as determined by the conversion of radioactive bicarbonate to ¹⁴CH₄, so that the carbon and electron flow to CH₄ was increasingly dominated by acetate, indicating that psychrotolerant homoacetogenesis was important. The relative composition of the archaeal community was determined by terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis of the 16S rRNA genes (16S rDNA). T-RFLP analysis differentiated the archaeal *Methanobacteriaceae*, *Methanomicrobiaceae*, *Methanosaetaceae*, *Methanosarcinaceae*, and Rice clusters I, III, IV, V, and VI, which were all present in the rice field soil incubated at different temperatures. The 16S rRNA genes of Rice cluster I and *Methanosaetaceae* were the most frequent methanogenic groups. The relative abundance of Rice cluster I decreased with temperature. The substrates used by this microbial cluster, and thus its function in the microbial community, are unknown. The relative abundance of acetoclastic methanogens, on the other hand, was consistent with their physiology and the acetate concentrations observed at the different temperatures, i.e., the high-acetate-requiring *Methanosarcinaceae* decreased and the more modest *Methanosaetaceae* increased with increasing temperature. Our results demonstrate that temperature not only affected the activity but also changed the structure and the function (carbon and electron flow) of a complex methanogenic system.

Methane is one of the most important greenhouse gases (7, 20, 49). With a contribution of about 15 to 20% to the anthropogenic CH₄ emissions, rice fields are one of the major sources for CH₄ (8, 26, 44). In addition, rice fields may be considered as a rather simple model system for vegetated wetland ecosystems. Methane is the final product of anaerobic degradation of organic matter, which is accomplished by a complex microbial community involving hydrolytic, fermenting, homoacetogenic, syntrophic, and methanogenic microorganisms (54, 60, 75, 76).

Temperature, salinity, redox potential, pH, availability of organic substrates, and nutrient concentration have been identified as the main factors influencing methanogenic degradation processes (9, 43). From these factors temperature is recognized as one of the most important (31, 53, 58). Temperature not only has an effect on the methane production itself but also has an effect on the decomposition of organic materials from which the methanogenic substrates are produced (4, 16, 32, 58, 68).

The most important precursors of CH₄ in anoxic rice field soil are acetate and H₂/CO₂, which theoretically contribute >67 and <33%, respectively, when polysaccharides are anaerobically degraded (11). Most studies indeed have found a slightly higher contribution of acetate, suggesting that homoacetogenesis is involved in the fermentation of the saccha-

rides (12, 51, 73). It is also assumed that the fraction of hydrogenotrophic methanogenesis decreases at low temperature, as the pathway of carbon and electron flow changes, when the temperature of the rice field soil (4, 16, 18), as well as of the lake sediment (56, 57), is shifted. Several authors demonstrated the existence of psychrotolerant homoacetogens which compete with methanogens for H₂ at low temperatures (17, 33, 34, 45). Up to 10% of the acetate in paddy soil slurries was found to be produced from CO₂ (51, 63). Even higher percentages (<40%) were found when acetoclastic methanogenesis was inhibited by methyl fluoride (12). Increased formation of acetate at low temperatures would result in increased contribution of acetoclastic methanogenesis to CH₄ production. On the other hand, it was found that homoacetogenesis from H₂/CO₂ should hardly be possible under in situ conditions for thermodynamic reasons (4, 52). Hence, the effect of temperature on the flow of carbon and electrons in methanogenic rice field soil is not completely clear.

There have been several attempts to get insight into the methanogenic archaeal community of rice field soil (30, 36, 50). Clone libraries of 16S rRNA genes retrieved from rice field soil recently showed a much higher diversity of the methanogenic community than expected from earlier cultivation studies and also revealed several novel phylogenetic lineages (5, 23, 24, 41). The following major phylogenetic lineages have been identified in the archaeal community in Italian rice field soil (5, 23, 24, 41): among the methanogens, the families of *Methanobacteriaceae*, *Methanomicrobiaceae*, *Methanosaetaceae*, and *Methanosarcinaceae*; in addition, the euryarchaeotal Rices

* Corresponding author. Mailing address: Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie, Karl-von-Frisch-Strasse, 35043 Marburg, Germany. Phone: 49 (6421) 178-801. Fax: 49 (6421) 178-809. E-mail: conrad@mail.uni-marburg.de.

TABLE 1. Gibbs free energies, enthalpies, and entropies of reactions involved in methanogenesis, homoacetogenesis, and propionate degradation under standard conditions^a

Reaction	kJ/reaction		
	ΔG^0	ΔH^0	ΔS^0
Methane production			
$4 \text{ H}_2 (\text{g}) + \text{CO}_2 (\text{g}) \rightarrow \text{CH}_4 (\text{g}) + 2 \text{ H}_2\text{O} (\text{l})$	-130.7	-252.9	-0.41
$\text{CH}_3\text{COO}^- (\text{aq}) + \text{H}^+ (\text{aq}) \rightarrow \text{CH}_4 (\text{g}) + \text{CO}_2 (\text{g})$	-75.7	+17.7	+0.314
Homoacetogenesis			
$4 \text{ H}_2 (\text{g}) + 2 \text{ CO}_2 (\text{g}) \rightarrow \text{CH}_3\text{COO}^- (\text{aq}) + \text{H}^+ (\text{aq}) + 2 \text{ H}_2\text{O} (\text{l})$	-55.1	-270.6	-0.723
$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 (\text{aq}) \rightarrow 3 \text{ CH}_3\text{COO}^- (\text{aq}) + 3 \text{ H}^+ (\text{aq})$	-197.5	-185.3	+0.041

^a That is, 1 M, 10^5 Pa, 298.14°K.

cluster I and II, which are probably methanogenic (38); the euryarchaeotal Rice clusters III and V, which are probably nonmethanogenic; and the crenarchaeotal Rice clusters IV and VI.

Recently, terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis was developed as a rapid PCR-based screening method (39) and was successfully applied to rice field soil (5, 41, 48). This method reveals not only information about the diversity (species richness) of an ecosystem but also information on the relative abundance of the different T-RFs (species evenness), which makes it a powerful tool for analysis of microbial communities (39, 47). Clone libraries of 16S rRNA genes created from rice field soil, the temperature of which was shifted to either 15 or 30°C, showed a completely different composition of the archaeal community (5). However, a quantification of the various archaeal T-RFs in methanogenic soil over a wide range of temperatures has not yet been done.

In general, studies of temperature effects in rice field soil were mostly restricted to a few temperatures and to relatively short-term temperature shifts (4, 69). These shifts may cause transient effects, which are different from those which are established when the system has come to steady state (66). Quasi-steady state conditions in rice field soil are reached quite some time after sulfate and ferric iron have been reduced. This happens faster at high temperatures than at low temperatures (65, 72) and is characterized by relatively low concentrations of H_2 and acetate and by constant and almost equal rates of CH_4 and CO_2 production (73, 74).

The purpose of the present study was to investigate the effect of temperature on the flow of carbon and electrons in rice field soil which is producing CH_4 under steady-state conditions. The temperatures in Italian rice fields range typically from 15 to 30°C (58). We chose a slightly larger range (10 to 37°C) for our experiments. The data were used to calculate the thermodynamic properties for the methanogenic and homoacetogenic processes. The relative fraction of methanogenesis from H_2/CO_2 was estimated by from the conversion of $^{14}\text{CO}_2$ to $^{14}\text{CH}_4$ (14). In addition, T-RFLP analysis was used to quantify the composition of the archaeal community at different temperatures.

MATERIALS AND METHODS

Soil samples. The soil samples were collected in March 1998 (after plowing) from the yet-unflooded rice fields of the Italian Rice Research Institute in Vercelli, Italy. The soil was air dried and stored as dry lumps at room temperature. It was a sandy-loamy silt (27% sand, 58% silt, 15% clay). The dry lumps were broken and passed through a stainless steel sieve (2 mm, pore size). For preparation of slurries the soil samples were suspended at a weight ratio of 1:1 in distilled anoxic sterile water.

Incubation of soil slurries. To obtain temperature effects at high resolution, soil slurries were incubated in a temperature gradient block, made from aluminum (length, 185 cm), that was heated at the one end and cooled at the other end

(1, 27). The block contained four rows each with 31 holes into which test tubes with soil slurries were fitted. Test tubes (16 ml) were filled with 3 g (dry weight) of soil and 3 ml of anoxic water, closed with black butyl rubber stoppers, and flushed with N_2 . To obtain methanogenic conditions, the samples were preincubated for 2 days at 30°C. Thereafter, they were put into the temperature gradient block which was kept at 10 to 37°C in 1°C intervals (four replicates). The concentrations of CH_4 , CO_2 , and H_2 in the gas headspace were determined weekly after the tubes were vigorously shaken for 30 s by hand to reach equilibration of the gas and liquid phase. At the end of incubation (after 89 to 127 days), liquid samples were taken for the analysis of fatty acids. Before sampling, the bottles were briefly mixed on a vortex mixer.

Other experiments were done analogously, using 60-ml serum bottles which were filled with 10 g (dry weight) of soil and 10 ml of anoxic water, closed with butyl rubber stoppers, and flushed with N_2 . The bottles were then preincubated at 10, 15, 20, 25, 30, and 37°C for 60 to 90 days (depending on temperature) until quasi-steady-state conditions were reached.

Radioactive experiments. The serum bottles containing CH_4 -producing soil slurry were evacuated for several minutes and then flushed at least six times with N_2 and evacuated to remove all CH_4 and CO_2 . Finally, the bottles were filled with N_2 to a pressure of 1.2×10^5 Pa. To estimate the fraction of CH_4 produced from H_2/CO_2 , ca. 50 kBq of $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ (2 GBq mmol⁻¹; Amersham) was added. The experiment was done twice with three and five replicates, respectively.

Analytical techniques. CH_4 and CO_2 were analyzed by gas chromatography using a flame ionization detector (Shimadzu, Kyoto, Japan). CO_2 was measured after conversion to CH_4 with a methanizer (nickel catalyst at 350°C; Chrompack, Middleburg, The Netherlands). H_2 was analyzed by gas chromatography using a HgO-to-Hg conversion detector (RGD2; Trace Analytical, Stanford, Calif.) (19). $^{14}\text{CH}_4$ and $^{14}\text{CO}_2$ were measured in a gas chromatograph equipped with a methanizer, a flame ionization detector, and a RAGA radioactivity gas proportional counter (Raytest, Straubenhardt, Germany) (18).

Liquid samples were transferred into 2-ml Eppendorf cups. The samples were centrifuged for 15 min (12,000 \times g; 4°C), and the supernatant was stored frozen at -26°C until analysis. Before analysis the thawed samples were again centrifuged (15 min) and filtered through 0.2- μm (pore-size) membrane filters (Minisart SRP 15; Sartorius, Göttingen, Germany). Fatty acids were measured by high-pressure liquid chromatography (Sykam, Gilching, Germany) with a refraction index detector, having a detection limit of 3 to 5 μM (35). The pH of all soil slurry samples was measured prior to centrifugation and filtration using a glass electrode.

Calculations. The apparent activation energy (E_a) of CH_4 production was calculated by linear regression of the natural logarithm of the CH_4 production rates (ν) against the reciprocal temperature (T [in degrees Kelvin]) between 10 and 37°C using the logarithmic form of the Arrhenius equation: $\ln \nu = -(E_a/R)(1/T) + \text{constant}$.

The fraction of CH_4 produced from H_2/CO_2 ($f_{\text{H}_2/\text{CO}_2}$) was determined from the specific radioactivities of CH_4 (SR_{CH_4}) and CO_2 (SR_{CO_2}) in the gas headspace of the bottles: $f_{\text{H}_2/\text{CO}_2} = \text{SR}_{\text{CH}_4}/\text{SR}_{\text{CO}_2}$ (14, 18).

Gibbs free-energy changes (ΔG) were calculated from the standard Gibbs free-energy changes (ΔG^0); the concentrations of products and substrates at steady state were as described earlier (15). Values of ΔG^0 of the reactions (Table 1) were calculated from the standard Gibbs free energies of formation (G_f^0) of the reactants and products (62) and were corrected for the actual temperature (T) by the Van't Hoff equation (13). The standard reaction enthalpy changes (ΔH^0 ; Table 1) were calculated from the enthalpies of formation (H_f^0) of the reactants and products (37, 61). The standard reaction entropy changes (ΔS^0 ; Table 1) were calculated from ΔG^0 , ΔH^0 , and the standard temperature ($T = 298.14^\circ\text{K}$): $\Delta S^0 = (\Delta H^0 - \Delta G^0)/T$.

DNA extraction from soil slurries. The samples for molecular analysis were taken from soil slurries that had been incubated for 60 to 90 days at different temperatures. The extraction procedure was a modification of previously described protocols (5, 23, 46, 59). A slurry sample (1 ml) was mixed with 0.5 ml of sodium phosphate buffer (pH 8.0, 120 mM), 200 μl of sodium dodecyl sulfate (10%), and 1 g of glass beads (0.17 to 0.18 mm in diameter). After incubation (10

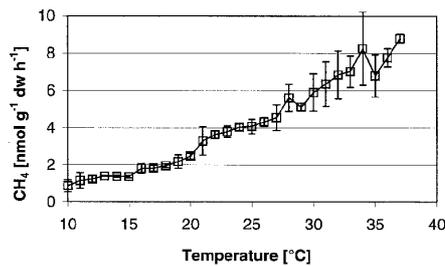


FIG. 1. Methane production rates in anaerobically incubated rice field soil under steady-state conditions. Shown are the means \pm the standard deviations (SD) ($n = 4$).

min, 65°C) and two 1-min cycles of bead beating (Mini-Bead-Beater; Biospec Products, Bartlesville, Okla.), the slurry was centrifuged (10 min, 13,000 \times g). The DNA was extracted from the supernatant using chloroform-isoamyl alcohol (24:1 [vol/vol]), and the extracts were precipitated with a 0.1 volume of sodium acetate (3 M, pH 5.3) and 2 volumes of ethanol and then purified with cesium chloride as described elsewhere (59).

Amplification of archaeal 16S rRNA genes. The 16S rDNA fraction of the DNA samples was amplified by PCR with the archaeal group-specific primers described by Grosskopf et al. (23), which amplify from positions 109 to 934 (*Escherichia coli* 16S rRNA numbering (3)) as described previously (5). The thermal profile used for amplification included 32 cycles of denaturation (45 s), primer annealing at 52°C (45 s), and elongation at 72°C (1 min).

T-RFLP analysis. The principle of the T-RFLP analysis has been described by Liu et al. (39). The backward primer was labeled 5' terminally with FAM (5-carboxyfluorescein). The SSU rDNA amplicons were purified by use of the QIAquick PCR purification kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the instructions of the manufacturer. Aliquots of the purified 16S rDNA were digested by *TaqI* (Promega, Mannheim, Germany) for 3 h at 65°C. Each 0.5-ml tube contained 2 to 6 μ l of the 16S rDNA amplicons, 1 μ l of the incubation buffer, and 1 μ l of restriction enzyme (10 U) made up to a total volume of 10 μ l with deionized water. Aliquots (2.5 μ l) of the digested 16S rDNA were mixed with 2.0 μ l of formamide and 0.5 μ l of an internal lane standard consisting of 17 different 6-carboxy-X-rhodamine (ROX)-labeled fragments ranging in length from 29 to 928 nucleotides (GeneScan-1000 ROX; PE Applied Biosystems). The samples were denatured at 94°C for 3 min and then immediately stored on ice until being loaded onto the gel. The electrophoresis and analysis of the resulting bands were performed as described previously (5).

RESULTS

Development of steady-state conditions. Incubation of slurries from rice field soil resulted in the production of CH_4 after a lag phase of about 2 days. The production of CO_2 started directly after preparation of the samples. In the same time initial peaks of H_2 and acetate were observed. Hydrogen started to decrease after the first 24 h of incubation and reached a stable partial pressure within 2 weeks. For acetate this decrease took about 25 days (37°C) or even more than 50 days (10°C) until the steady-state concentration was reached. Other fatty acids, such as propionate, lactate, isobutyrate, butyrate, isovalerate, valerate, and caproate, were only observed in the beginning of the incubation and disappeared at all temperatures within the first month. After this time the CO_2 accumulation decreased and reached a stable rate. Methane was first produced with high rates which dropped after a while to lower but stable production rates. This phase was reached after between 60 and 90 days at 37 and 10°C, respectively. This phase is referred to below as the steady state.

Steady-state conditions at different temperatures. The steady-state CH_4 production rates per gram of dry soil increased with increasing temperature from about 1 $\text{nmol g}^{-1} \text{h}^{-1}$ (at 10°C) to 9 $\text{nmol g}^{-1} \text{h}^{-1}$ (at 37°C) (Fig. 1). This almost linear increase resulted in an apparent activation energy of $61 \pm 1 \text{ kJ mol}^{-1}$, equivalent to Q_{10} values of 2.8 (10 to 20°C) and 1.8 (27 to 37°C). The steady-state pH values in the slurries

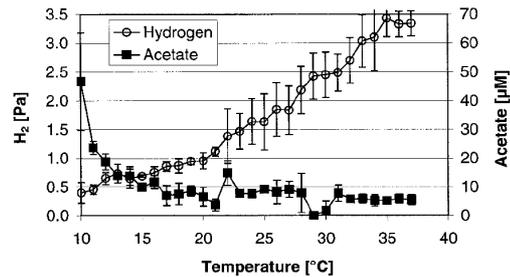


FIG. 2. Hydrogen partial pressure in the gas phase and acetate concentration in the pore water of anaerobically incubated rice field soil under steady state conditions. Shown are the means \pm the SD ($n = 4$).

slightly decreased with temperature and ranged from pH 7.4 to pH 6.9. Steady-state partial pressures of H_2 linearly increased with temperature from $<0.5 \text{ Pa}$ (10°C) to ca. 3.5 Pa ($\geq 35^\circ\text{C}$) (Fig. 2). In contrast, acetate steady-state concentrations were constant at about $5 \mu\text{M}$ at between 17 and 37°C but increased as the temperature decreased below 17°C , reaching about $50 \mu\text{M}$ at 10°C (Fig. 2). This increase resulted in a more negative ΔG for acetoclastic methanogenesis at temperatures that were lower than 17°C ($-27 \text{ kJ mol of } \text{CH}_4^{-1}$ at 10°C ; Fig. 3) than at 17 to 37°C , where the ΔG was constant at -15 to $-20 \text{ kJ mol of } \text{CH}_4^{-1}$. In contrast to that, the ΔG of hydrogenotrophic methane production was constant at a level of -20 to $-25 \text{ kJ mol of } \text{CH}_4^{-1}$ over the whole temperature range (10 to 37°C). The energy available for homoacetogenesis was always very low ($\Delta G > -7.2 \text{ kJ mol of acetate}^{-1}$).

Radioactive experiments. Two experiments with radiolabeled bicarbonate showed the theoretically expected contribution of hydrogenotrophic methanogenesis of about one-third to the total methanogenesis at 30 and 37°C (Fig. 4). But with decreasing temperatures this contribution decreased and resulted in a contribution of only 10 to 15% at 10°C . This means that as much as 85 to 90% of the CH_4 was then produced via acetate.

T-RFLP analysis. A typical T-RFLP pattern of the archaeal 16S rRNA genes amplified from total community DNA extracted from soil slurry at 10°C is shown in Fig. 5. The marked fragments (T-RFs) correspond to phylogenetic lineages that were characterized by cloning and sequencing (for details, see

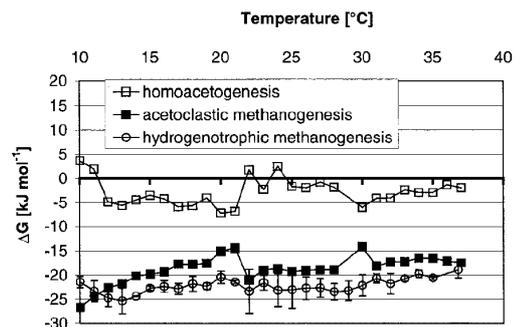


FIG. 3. Gibbs free energies of methane production and homoacetogenic H_2 consumption calculated for the actual conditions of the anaerobically incubated rice field soil under steady state conditions. The typical SD ($n = 4$) is only shown for hydrogenotrophic methanogenesis as an example.

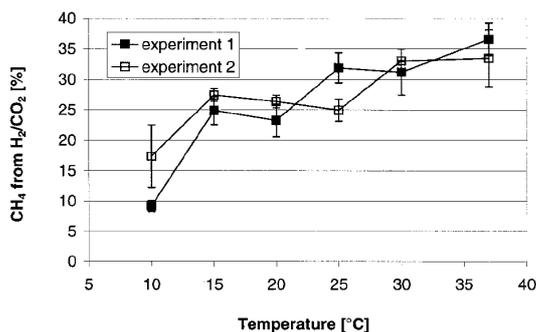


FIG. 4. Fraction of CH_4 produced from H_2/CO_2 in rice field soil as determined in two independent experiments. Shown are the means \pm the SD ($n = 3$ or 5, respectively).

references 5 and 41). Some of the T-RFs can come from more than one phylogenetic lineage. The relative frequency of the individual T-RFs among the total archaeal community was determined from the relative peak areas using all peaks of $\geq 1\%$ of the total peak area. Ramakrishnan et al. (48) showed that the relative proportion of T-RFs was independent of the number of PCR cycles between 22 and 44 cycles. The results obtained at the different temperatures using 32 PCR cycles are summarized in Fig. 6. The T-RFs characteristic for the euryarchaeotal Rice cluster I and the *Methanosarcinaceae* came out to be the most dominant ones in rice field soil. The abundance of Rice cluster I, as well as of *Methanosarcinaceae*, decreased with increasing temperature, while the *Methanosarcinaceae* became more dominant at higher temperature. The quantification of the *Methanosarcinaceae* and *Methanomicrobiaceae* can be biased, since their T-RFs are also characteristic for some members of Rice cluster VI. Similarly, the T-RF of *Methanosarcinaceae* may also contain Rice clusters IV and V (5, 41). Other T-RFs were characteristic for *Methanobacteriaceae*, the euryarchaeotal Rice cluster III, and the crenarchaeotal Rice cluster IV. Fragments which could not be assigned to any known lineage were collected as "diverse." Fragments with a length of 810 bp or longer were considered to be undigested DNA.

DISCUSSION

Our experiments focused on the quasi-steady-state conditions in a methanogenic rice field soil as affected by different constant temperatures. These conditions are artificial, since rice fields normally undergo diel temperature changes. However, they serve as a model for the principle effect of temperature on the function of a methanogenic microbial community. Our experiments demonstrate that temperature not only affected the rate of CH_4 production in anoxic rice soil but also influenced the pathway of carbon and electron flow during methanogenic degradation of organic matter and the composition of the methanogenic microbial community. With increasing temperature, the carbon flow via acetate decreased relative to that via H_2/CO_2 . The steady-state concentrations of H_2 increased, thus resulting in thermodynamic homeostasis of H_2 -dependent methanogenesis. Acetate concentrations, on the other hand, decreased, thus resulting in decreasing energy available for acetoclastic methanogenesis. Simultaneously, the acetoclastic methanogenic microbial community was increasingly dominated by *Methanosarcinaceae* relative to *Methanosarcinaceae*. Our results for the first time provide a rather comprehensive picture of how temperature affects the microbial structure and the function of a methanogenic environment.

Influence of temperature on CH_4 production rates. In soil slurry that was preincubated at 30°C , CH_4 production started after a lag phase of 2 days, during which ferric iron and sulfate were reduced and organic matter was predominantly degraded to CO_2 . This initial reduction phase was followed by relatively high CH_4 production rates which progressively slowed down until a quasi-steady state was reached. The sequential reduction process and the different phases of CH_4 production have been characterized in detail for various rice field soils (71, 74). A three-phase conceptual model, with reduction phase (I), methanogenic phase (II), and steady-state phase (III) was proposed by Yao et al. (74) and put into a process model by vanHulzen et al. (64). The model indicates that the CH_4 production rate is first limited by the methanogens themselves (phase II) and later on by the carbon mineralization rate (phase III). The effect of temperature on the lag phase until the quasi-steady state is reached has been characterized (64, 72), and our results agree. Quasi-steady-state CH_4 production was reached after 60 to 90 days, depending on the incubation temperature. Production rates of CH_4 during the quasi-steady state increased with temperature, with an apparent activation energy of 61 kJ mol^{-1} or a Q_{10} of 1.8 to 2.8, which is consistent

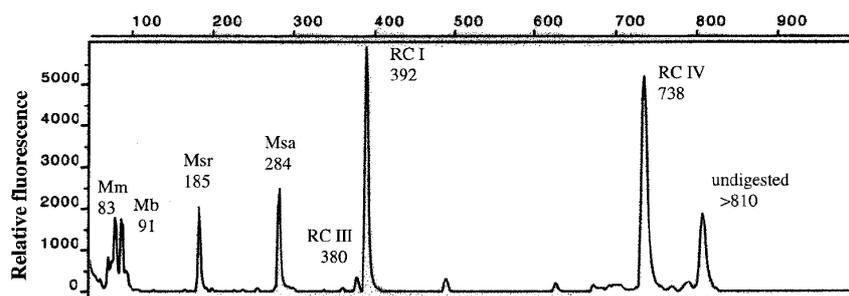


FIG. 5. T-RFLP pattern of 16S rDNA extracted from anoxic rice field soil at 10°C . The numbers indicate the length of the fragment in base pairs. Mm, *Methanomicrobiaceae*; Mb, *Methanobacteriaceae*; Msr, *Methanosarcinaceae*; Msa, *Methanosarcinaceae*; RC I, Rice cluster I; RC III, Rice cluster III; RC IV, Rice cluster IV.

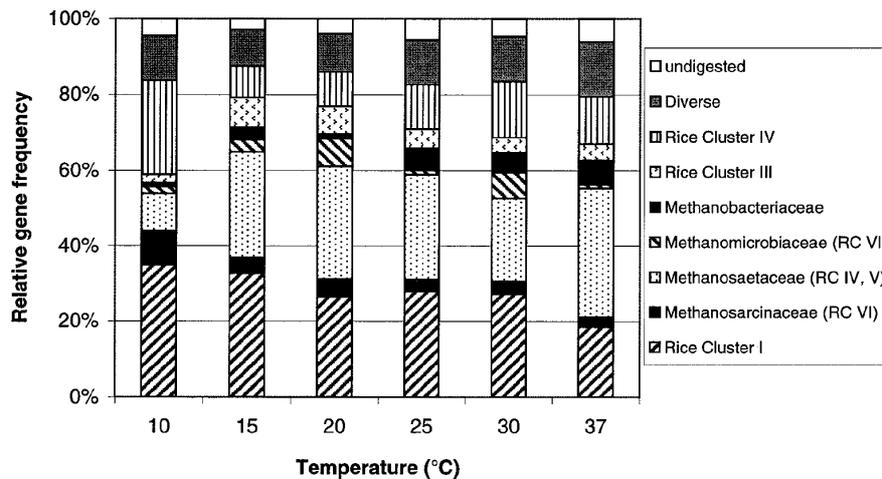


FIG. 6. Archaeal population in anaerobically incubated rice field soil under steady-state conditions. The figure shows the relative abundances of T-RFs used as a measure of the composition of the archaeal microbial community. The frequencies were calculated from three replicates using the areas of all detected fragments that were $>1\%$ of the total area. The mean SD of the relative abundances of the T-RFs was $3.2 \pm 0.4\%$. Note that the T-RFs characteristic for *Methanomicrobiaceae*, *Methanosaetaceae*, and *Methanosarcinaceae* may also contain T-RFs of those rice clusters indicated in parentheses.

with earlier results obtained with rice soil microcosms and carbon-limited soil slurries (58, 64, 72).

Steady-state concentrations of hydrogen. The H_2 partial pressures showed a clear increase with temperature. Similar results have been obtained with freshwater sediments (66), marine sediments (25), and also with pure cultures of methanogens (13). As a consequence of the increase of H_2 with temperature, the Gibbs free-energy available for H_2 -dependent methanogenesis stayed constant at a level of -20 to -25 kJ mol of CH_4^{-1} for the whole temperature range. This free energy should be sufficient for the generation of one-third ATP (approximately -23 kJ mol of CH_4^{-1}) which is expected to be the minimum energy required for growth (55). Similar values were observed in various rice field soils from the major rice-growing areas (70), in rice soil supplemented with straw (22), and also in various other methanogenic environments (reviewed in reference 11). All these data are consistent with the concept that H_2 -dependent methanogenesis is thermodynamically controlled. Hence, the Gibbs free energies that are calculated from the H_2 partial pressures (10, 13, 25), rather than the H_2 partial pressures themselves (40), are characteristic for environments in which the anaerobic degradation is dominated by methanogenesis versus sulfate reduction, iron reduction, etc.

Steady-state concentrations of acetate. In contrast to H_2 , the acetate concentration did not increase with temperature but instead decreased by up to about $20^\circ C$ and then stayed constant at a very low level. Consequently, the energy available for acetoclastic methanogenesis decreased with temperature. Acetate apparently does not have the same regulating function for methanogenesis as does H_2 . This conclusion is consistent with observations by Westermann (66), who found a constant concentration of acetate and propionate at between 2 and $37^\circ C$. It is also consistent with the study of various rice field soils in which only the Gibbs free energies of H_2 -dependent but not of acetate-dependent methanogenesis regulated total CH_4 production (70).

Contribution of H_2/CO_2 and acetate to total CH_4 production. Our results show that the relative contribution of H_2/CO_2 -dependent methanogenesis increased with temperature. Consequently, acetate-dependent methanogenesis decreased. Our results are in contrast to observations in a tidal freshwater estuarine sediment in which the production of CH_4 from CO_2 was constant at about 25% at between 8 and $32^\circ C$ (2). However, our results confirm earlier studies on anoxic rice soil which, however, were restricted to only two different temperatures (4, 16). There are three possible explanations for the observed decrease of H_2/CO_2 to CH_4 production with decreasing temperature.

(i) The contribution of homoacetogenesis to the total flux of carbon and electrons increases with decreasing temperature, thus causing a relative increase of acetate as methanogenic precursor.

(ii) The composition of the methanogenic microbial community changes with temperature and so does the relative activity of different physiological groups of microorganisms.

(iii) The fluidity of the microbial cytoplasmic membrane changes with temperature so that the turnover of acetate is affected differently than the turnover of H_2 .

Membrane fluidity. Concerning the last point, it is well known that microorganisms adapt to decreasing temperature by changing the lipid composition to alleviate the increasing viscosity of the cytoplasmic membrane. Nevertheless, temperature decrease often results in decreased efficiency of transport proteins and decreased specific affinity of substrate utilization (42). Since acetate has to be transported over the membrane, while H_2 is freely diffusible, one might expect that decreasing temperature inhibits the utilization of acetate more than that of H_2 .

This very effect has been found in cultures of *Methanosarcina barkeri*, in which the specific affinity for H_2 was better compensated for at decreasing temperatures than that for acetate (67). In conclusion, decreasing temperatures may in particular affect acetate utilization negatively and thus explain why

steady-state acetate concentrations in methanogenic rice soil increased. However, it does not explain why acetate became a more important methanogenic precursor than H_2 . It also should be noted that the ability for temperature compensation is different for different microbial species, and thus a complex microbial community, containing both psychrophiles and mesophiles, can probably better adapt to temperature changes than can a single species.

The archaeal community. The community of methanogenic archaea was indeed rather complex and changed in composition with changing temperature. The results from the T-RFLP analysis showed the presence of all the archaeal groups that had previously been detected in Italian rice field soil (5, 23, 24, 41). The most obvious effect was the increase of the relative abundance of *Methanosaetaceae* with increasing temperature, in contrast to a decrease of *Methanosarcinaceae*, which were most common at the lowest temperature. Although the T-RFLP pattern may to some extent be biased since the T-RFLPs characteristic for *Methanosaetaceae* and *Methanosarcinaceae* may partially be caused by T-RFLPs of Rice clusters IV, V, and VI (5, 41), the pattern is nevertheless intriguing, since it is consistent with the observation that acetate concentrations have been much lower at high versus low temperatures and the fact that *Methanosaetaceae* have a lower threshold for acetate than do *Methanosarcinaceae* (28, 29). Therefore, *Methanosarcinaceae* may be unable to grow at the low acetate concentrations observed at high temperatures and be replaced by the better-adapted *Methanosaetaceae*. However, it cannot be completely ruled out that the observed pattern of T-RFLPs was biased by archaeal lineages other than *Methanosaetaceae* and *Methanosarcinaceae*.

At a first glance, our results seem to be in contradiction to earlier observations by Chin et al. (5), who found that *Methanosarcinaceae* dominated in rice soil at 30°C while *Methanosaetaceae* dominated at 15°C. These authors also reported the dominance of the *Methanosaetaceae* over *Methanosarcinaceae* at 15°C (and vice versa at 30°C) in anaerobic cellulose-degrading enrichment cultures inoculated with rice field soil (6). In all of these previous experiments, however, acetate concentrations were always >100 μ M and thus not discriminative for the lower thresholds of the *Methanosaetaceae*. Under these conditions, the temperature itself or an unknown factor related to temperature change was obviously selective for *Methanosaetaceae* and *Methanosarcinaceae* at low and high temperatures, respectively. The capacity for compensation of the changing membrane fluidity may play an important role (see above). Hence, it appears that temperature affects the microorganisms both directly (proximally) and indirectly (distally). We assume that the proximal temperature effect was responsible for the selection of methanogens in the relatively short-term experiments by Chin and Conrad (4) and Chin et al. (5), while distal effects (via acetate concentration) were responsible for the selection under the quasi-steady-state conditions in our experiments.

Temperature also affected the relative abundance of the euryarchaeotal Rice cluster I, which decreased with increasing temperature. Rice cluster I probably contains methanogenic archaea because of the phylogenetic position of this cluster (24) and of its presence in methanogenic enrichment cultures (38). However, the physiological properties of this group, and thus the function in the methanogenic system, are unknown.

Although temperature did exhibit a clear effect on the composition of the methanogenic archaeal community, these structural differences do not explain the observed effects on the carbon and electron flow, in particular why acetate dominated

over H_2/CO_2 as the methanogenic precursor especially at low temperatures.

Homoacetogenesis. It is possible that H_2/CO_2 -dependent acetate production was less temperature-sensitive than H_2/CO_2 -dependent methanogenesis. This would explain the relative decrease of H_2 as a methanogenic precursor with decreasing temperature. It was shown, however, that homoacetogenesis require a Gibbs free energy of at least -5 to -6 kJ mol of H_2^{-1} (13) which corresponds to -20 to -24 kJ mol of acetate $^{-1}$. The most negative ΔG values for homoacetogenesis observed in our study were ca. -7 kJ mol of acetate $^{-1}$. Similar values, in the same unfavorable range, have been observed before in anoxic rice soil (4, 22, 52). Therefore, we have to assume that homoacetogenesis from H_2/CO_2 plays only a minor role in anoxic rice field soil. This conclusion is consistent with radio-tracer studies which found only <10% of the acetate being produced from $^{14}CO_2$ (51, 63). However, since homoacetogenesis are highly versatile organisms (21), we assume that psychrotolerant homoacetogenesis are involved in the production of acetate from saccharides or other organic substrates (4). The standard Gibbs free-energy change of acetate production by homoacetogenic sugar fermentation is only slightly affected by a temperature change, as shown by the small standard entropy change ($\Delta S^0 = 0.04$ kJ mol $^{-1}$ K $^{-1}$; Table 1) because of $\Delta G^0_T = \Delta G^0 - \Delta S^0 (T - 298.14)$. The consumption of acetate by acetoclastic methanogenesis, on the other hand, is becoming less exergonic at decreasing temperature ($\Delta S^0 = 0.31$ kJ mol $^{-1}$ K $^{-1}$; Table 1) and thus has to be compensated for by an increasing acetate concentration, being in agreement with our observations.

Conclusion. We found that temperature affected the carbon and electron flow in methanogenic rice soil under quasi-steady-state conditions and also affected the composition of the archaeal community. Acetate became the increasingly more important methanogenic precursor when the temperature decreased. This resulted in higher steady-state concentrations of acetate, which in turn allowed proliferation of the fast growing acetoclastic *Methanosarcinaceae*, while slow-growing but more modest *Methanosaetaceae* were selected by the low acetate concentrations at higher temperatures. It is unclear, however, why acetate became relatively more important at low temperatures. Possibly, psychrotolerant homoacetogenesis prevailed over fermenting bacteria, thus reducing the product spectrum to just acetate. Such a prevalence is thermodynamically reasonable (see above) but does not offer a mechanistic explanation. Without a mechanistic explanation we are unable to extrapolate from the situation encountered in anoxic rice soil to other methanogenic environments. In particular, we will need to study how temperature affects the community of fermenting, syntrophic, and homoacetogenic bacteria.

ACKNOWLEDGMENT

We thank K. J. Chin, H. Lüdemann, and T. Lukow for their help and for technical instructions during the T-RFLP analysis.

The Fonds der Chemischen Industrie provided financial support. This study was part of the Sonderforschungsbereich 395 of the Deutsche Forschungsgemeinschaft "Interaction, Adaptation, and Catalytic Capacity of Terrestrial Microorganisms."

REFERENCES

1. Arnosti, C., B. B. Jørgensen, J. Sagemann, and B. Thamdrup. 1998. Temperature dependence of microbial degradation of organic matter in marine sediments. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **165**:59–70.
2. Avery, G. B., Jr., and C. S. Martens. 1999. Controls on the stable isotopic composition of biogenic methane produced in a tidal freshwater estuarine sediment. *Geochim. Cosmochim. Acta* **63**:1075–1082.
3. Brosius, J., M. L. Palmer, P. J. Kennedy, and H. R. Noller. 1978. Complete

- nucleotide sequence of a 16S ribosomal RNA gene from *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75:4801–4805.
4. **Chin, K. J., and R. Conrad.** 1995. Intermediary metabolism in methanogenic paddy soil and the influence of temperature. FEMS Microbiol. Ecol. 18:85–102.
 5. **Chin, K. J., T. Lukow, and R. Conrad.** 1999. Effect of temperature on structure and function of the methanogenic archaeal community in an anoxic rice field soil. Appl. Environ. Microbiol. 65:2341–2349.
 6. **Chin, K. J., T. Lukow, S. Stubner, and R. Conrad.** 1999. Structure and function of the methanogenic archaeal community in stable cellulose-degrading enrichment cultures at two different temperatures (15 and 30°C). FEMS Microbiol. Ecol. 30:313–326.
 7. **Cicerone, R. J., and R. S. Oremland.** 1988. Biogeochemical aspects of atmospheric methane. Blob. Biogeochem. Cycles 2:299–327.
 8. **Cole, C. V., C. Cerri, K. Minami, A. Mosier, N. Rosenberg, D. Sauerbeck, D. Dumanski, J. Duxbury, J. Freney, R. Gupta, O. Heinemeyer, T. Kolchugina, J. Lee, K. Paustian, D. Powlson, N. Sampson, H. Tiessen, M. Van Noordwijk, and Q. Zhao.** 1996. Agricultural options for mitigation of greenhouse gas emissions, p. 745–771. In R. T. Watson, M. C. Zinyowera, and R. H. Moss (ed.), Climate change 1995: impacts, adaptations, and mitigation of climate change: scientific-technical analyses. Intergovernmental Panel on Climate Change/Cambridge University Press, Cambridge, England.
 9. **Conrad, R.** 1993. Mechanisms controlling methane emission from wetland rice fields, 317–335. In R. S. Oremland (ed.), The biogeochemistry of global change: radiative trace gases. Chapman & Hall, New York, N.Y.
 10. **Conrad, R.** 1996. Anaerobic hydrogen metabolism in aquatic sediments. Mitt. Internat. Verein. Limnol. 25:15–24.
 11. **Conrad, R.** 1999. Contribution of hydrogen to methane production and control of hydrogen concentrations in methanogenic soils and sediments. FEMS Microbiol. Ecol. 28:193–202.
 12. **Conrad, R., and M. Klöse.** 1999. How specific is the inhibition by methyl fluoride of acetoclastic methanogenesis in anoxic rice field soil? FEMS Microbiol. Ecol. 30:47–56.
 13. **Conrad, R., and B. Wetter.** 1990. Influence of temperature on energetics of hydrogen metabolism in homoacetogenic, methanogenic, and other anaerobic bacteria. Arch. Microbiol. 155:94–98.
 14. **Conrad, R., and H. Schütz.** 1988. Methods of studying methanogenic activities in aquatic environments, p. 301–343. In B. Austin (ed.), Methods in aquatic bacteriology. Wiley, Chichester, England.
 15. **Conrad, R., B. Schink, and T. J. Phelps.** 1986. Thermodynamics of H₂-consuming and H₂-producing metabolic reactions in diverse methanogenic environments under in situ conditions. FEMS Microbiol. Ecol. 38:353–360.
 16. **Conrad, R., H. Schütz, and M. Babel.** 1987. Temperature limitation of hydrogen turnover and methanogenesis in anoxic paddy soil. FEMS Microbiol. Ecol. 45:281–289.
 17. **Conrad, R., F. Bak, H. J. Seitz, B. Thebrath, H.-P. Mayer, and H. Schütz.** 1989. Hydrogen turnover by psychrotrophic homoacetogenic and mesophilic bacteria in anoxic paddy soil and lake sediment. FEMS Microbiol. Ecol. 62:285–294.
 18. **Conrad, R., H.-P. Mayer, and M. Wüst.** 1989. Temporal change of gas metabolism by hydrogen-syntrophic methanogenic bacterial associations in anoxic paddy soil. FEMS Microbiol. Ecol. 62:265–274.
 19. **Cord-Ruwisch, R., H.-J. Seitz, and R. Conrad.** 1988. The capacity of hydrogenotrophic anaerobic bacteria to compete for traces of hydrogen depends on the redox potential of the terminal electron acceptor. Arch. Microbiol. 149:350–357.
 20. **Crutzen, P. J.** 1995. The role of methane in atmospheric chemistry and climate, p. 291–315. In W. von Engelhardt, S. Leonhardt-Marek, G. Breves, and D. Giesecke (ed.), Ruminant physiology: digestion, metabolism, growth and reproduction. Enke, Stuttgart, Germany.
 21. **Drake, H. L.** 1994. Acetogenesis. Chapman & Hall, London, England.
 22. **Glissmann, K., and R. Conrad.** 2000. Fermentation pattern of methanogenic degradation of rice straw in anoxic paddy soil. FEMS Microbiol. Ecol. 31:117–126.
 23. **Grosskopf, R., P. H. Janssen, and W. Liesack.** 1998. Diversity and structure of the methanogenic community in anoxic paddy soil microcosms as examined by cultivation and direct 16S rRNA gene sequence retrieval. Appl. Environ. Microbiol. 64:960–969.
 24. **Grosskopf, R., S. Stubner, and W. Liesack.** 1998. Novel euryarchaeal lineages detected on rice roots and in the anoxic bulk soil of flooded rice microcosms. Appl. Environ. Microbiol. 64:4983–4989.
 25. **Hoehler, T. M., M. J. Alperin, D. B. Albert, and C. S. Martens.** 1998. Thermodynamic control on hydrogen concentrations in anoxic sediments. Geochim. Cosmochim. Acta 62:1745–1756.
 26. **Intergovernmental Panel on Climate Change.** 1992. Climate change 1992. Supplementary Report to the IPCC Scientific Assessment. Intergovernmental Panel on Climate Change, Cambridge, United Kingdom.
 27. **Isaksen, I. M., F. Bak, and B. B. Jørgensen.** 1994. Thermophilic sulfate-reducing bacteria in cold marine sediment. FEMS Microbiol. Ecol. 14:1–8.
 28. **Jetten, M. S. M., A. J. M. Stams, and A. J. B. Zehnder.** 1990. Acetate threshold values and acetate activating enzymes in methanogenic bacteria. FEMS Microbiol. Ecol. 73:339–344.
 29. **Jetten, M. S. M., A. J. M. Stams, and A. J. B. Zehnder.** 1992. Methanogenesis from acetate: a comparison of the acetate metabolism in *Methanotheroxigenium* and *Methanosarcina* spp. FEMS Microbiol. Rev. 88:181–198.
 30. **Joulian, C., B. Ollivier, B. K. C. Patel, and P. A. Roger.** 1998. Phenotypic and phylogenetic characterization of dominant culturable methanogens isolated from ricefield soils. FEMS Microbiol. Ecol. 25:135–145.
 31. **Khalil, M. A. K., R. A. Rasmussen, M. J. Shearer, R. W. Dallage, L. Ren, and C.-H. Duan.** 1998. Factors affecting methane emissions from rice fields. J. Geophys. Res. 103:25219–25231.
 32. **Kimura, M., T. Minoda, and J. Murase.** 1993. Water-soluble organic materials in paddy soil ecosystem. Soil Sci. Plant Nutr. 39:713–724.
 33. **Kotsyurbenko, O. R., A. N. Nozhevnikova, and G. A. Zavarzin.** 1993. Methanogenic degradation of organic matter by anaerobic bacteria at low temperature. Chemosphere 27:1745–1761.
 34. **Kotsyurbenko, O. R., A. N. Nozhevnikova, T. I. Soloviova, and G. A. Zavarzin.** 1996. Methanogenesis at low temperatures by microflora of tundra wetland soil. Antonie Leeuwenhoek 69:75–86.
 35. **Krummbock, M., and R. Conrad.** 1991. Metabolism of position Ia: belled glucose in anoxic-methanogenic paddy soil and lake sediment. FEMS Microbiol. Ecol. 85:247–256.
 36. **Kudo, Y., T. Nakajima, T. Miyaki, and H. Oyaizu.** 1997. Methanogen flora of paddy soils in Japan. FEMS Microbiol. Ecol. 22:39–48.
 37. **Lange, N. A.** 1979. Handbook of chemistry. McGraw-Hill, New York, N.Y.
 38. **Lehmann-Richter, S., R. Großkopf, W. Liesack, P. Frenzel, and R. Conrad.** 1999. Methanogenic archaea and CO₂-dependent methanogenesis on washed rice roots. Environ. Microbiol. 1:159–166.
 39. **Liu, W.-T., T. L. Marsh, H. Cheng, and L. J. Forney.** 1997. Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. Appl. Environ. Microbiol. 63:4516–4522.
 40. **Lovley, D. R., and S. Goodwin.** 1988. Hydrogen concentrations as an indicator of the predominant terminal electron-accepting reactions in aquatic sediments. Geochim. Cosmochim. Acta 52:2993–3003.
 41. **Lueders, T., and M. Friedrich.** 2000. Archaeal population dynamics during sequential reduction processes in rice field soil. Appl. Environ. Microbiol. 66:2732–2742.
 42. **Nedwell, D. B.** 1999. Effect of low temperature on microbial growth: lowered affinity for substrates limits growth at low temperature. FEMS Microbiol. Ecol. 30:101–111.
 43. **Neue, H.-U., and P. A. Roger.** 1993. Rice agriculture: factors controlling emissions, p. 254–298. In M. A. K. Khalil (ed.), Atmospheric methane: sources, sinks and role in global change. Springer-Verlag, Berlin, Germany.
 44. **Neue, H.-U., and R. L. Sass.** 1994. Trace gas emissions from rice fields, p. 119–147. In R. G. Prinn (ed.), Global atmospheric-biospheric chemistry. Plenum Press, New York, N.Y.
 45. **Nozhevnikova, A. N., O. R. Kotsyurbenko, and M. V. Simankova.** 1994. Acetogenesis at low temperature, p. 416–431. In H. L. Drake (ed.), Acetogenesis. Chapman & Hall, London, England.
 46. **Ogram, A., G. S. Saylor, and T. Barkay.** 1987. The extraction and purification of microbial DNA from sediments. J. Microbiol. Methods 7:57–66.
 47. **Osborn, A. M., E. R. B. Moore, and K. N. Timmis.** 2000. An evaluation of terminal-restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis for the study of microbial community structure and dynamics. Environ. Microbiol. 2:39–50.
 48. **Ramakrishnan, B., T. Lueders, R. Conrad, and M. Friedrich.** 2000. Effect of soil aggregate size on methanogenesis and archaeal community structure in anoxic rice field soil. FEMS Microbiol. Ecol. 32:261–270.
 49. **Rasmussen, R. A., and M. A. K. Khalil.** 1981. Atmospheric methane (CH₄): trends and seasonal cycles. J. Geophys. Res. 86:9826–9832.
 50. **Reichardt, W., G. Mascarina, B. Padre, and J. Doll.** 1997. Microbial communities of continuously cropped, irrigated rice fields. Appl. Environ. Microbiol. 63:233–238.
 51. **Rothfuss, F., and R. Conrad.** 1993. Vertical profiles of CH₄ concentrations, dissolved substrates and processes involved in CH₄ production in a flooded Italian rice field. Biogeochemistry 18:137–152.
 52. **Roy, R., H. D. Klüber, and R. Conrad.** 1997. Early initiation of methane production in anoxic rice soil despite the presence of oxidants. FEMS Microbiol. Ecol. 24:311–320.
 53. **Sass, R. L., F. M. Fisher, F. T. Turner, and M. F. Jund.** 1991. Methane emission from rice fields as influenced by solar radiation, temperature, and straw incorporation. Global Biogeochem. Cycles 5:335–350.
 54. **Schink, B.** 1992. Syntrophism among prokaryotes, p. 276–299. In A. Balows, H. G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder, and K. H. Schleifer (ed.), The prokaryotes. Springer-Verlag, New York, N.Y.
 55. **Schink, B.** 1997. Energetics of syntrophic cooperation in methanogenic degradation. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 61:262–280.
 56. **Schulz, S., and R. Conrad.** 1996. Influence of temperature on pathways to methane production in the permanently cold profundal sediment of Lake Constance. FEMS Microbiol. Ecol. 20:1–14.
 57. **Schulz, S., H. Matsuyama, and R. Conrad.** 1997. Temperature dependence of methane production from different precursors in a profundal sediment (Lake Constance). FEMS Microbiol. Ecol. 22:207–213.

58. Schütz, H., W. Seiler, and R. Conrad. 1990. Influence of soil temperature on methane emission from rice paddy fields. *Biogeochemistry* **11**:77–95.
59. Smalla, K., N. Cresswell, L. C. Mendonca-Hagler, A. Wolters, and J. D. van Elsas. 1993. Rapid DNA extraction protocol from soil for polymerase chain reaction-mediated amplification. *J. Appl. Bacteriol.* **74**:78–85.
60. Stams, A. J. M. 1994. Metabolic interactions between anaerobic bacteria in methanogenic environments. *Antonie Leeuwenhoek* **66**:271–294.
61. Stumm, W., and J. J. Morgan. 1996. *Aquatic chemistry*, 3rd ed. John Wiley & Sons, Inc., New York, N.Y.
62. Thauer, R. K., K. Jungermann, and K. Decker. 1977. Energy conservation in chemotrophic anaerobic bacteria. *Bacteriol. Rev.* **41**:100–180.
63. Thebrath, B., H.-P. Mayer, and R. Conrad. 1992. Bicarbonate-dependent production and methanogenic consumption of acetate in anoxic paddy soil. *FEMS Microbiol. Ecol.* **86**:295–302.
64. VanHulzen, J. B., R. Segers, P. M. van Bodegom, and P. A. Leffelaar. 1999. Temperature effects on soil methane production: an explanation for observed variability. *Soil Biol. Biochem.* **31**:1919–1929.
65. VanBodegom, P. M., and A. J. M. Stams. 1999. Effects of alternative electron acceptors and temperature on methanogenesis in rice paddy soils. *Chemosphere* **39**:167–182.
66. Westermann, P. 1994. The effect of incubation temperature on steady-state concentrations of hydrogen and volatile fatty acids during anaerobic degradation in slurries from wetland sediments. *FEMS Microbiol. Ecol.* **13**:295–302.
67. Westermann, P., B. K. Ahring, and R. A. Mah. 1989. Temperature compensation in *Methanosarcina barkeri* by modulation of hydrogen and acetate affinity. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**:1262–1266.
68. Yamane, I., and K. Sato. 1967. Effect of temperature on the decomposition of organic substances in flooded soil. *Soil Sci. Plant Nutr.* **13**:94–100.
69. Yang, S.-S., and H.-L. Chang. 1998. Effect of environmental conditions on methane production and emission from paddy soil. *Agric. Ecosyst. Environ.* **69**:69–80.
70. Yao, H., and R. Conrad. 1999. Thermodynamics of methane production in different rice paddy soils from China, the Philippines and Italy. *Soil Biol. Biochem.* **31**:463–473.
71. Yao, H., and R. Conrad. 1999. Effect of soil characteristics on sequential reduction and methane production in sixteen rice paddy soils from China, the Philippines, and Italy. *Biogeochemistry* **47**:269–295.
72. Yao, H., and R. Conrad. Effect of temperature on reduction of iron and production of carbon dioxide and methane in anoxic wetland rice soils. *Biol. Fertil. Soils*, in press.
73. Yao, H., and R. Conrad. Electron balance during steady state production of CH₄ and CO₂ in anoxic rice soil. *Eur. J. Soil Sci.*, in press.
74. Yao, H., R. Conrad, R. Wassmann, and H. U. Neue. 1999. Effect of soil characteristics on sequential reduction and methane production in sixteen rice paddy soils from China, the Philippines, and Italy. *Biogeochemistry* **47**:269–295.
75. Zehnder, A. J. B. 1978. Ecology of methane formation, p. 349–376. *In* R. Mitchell (ed.), *Water pollution microbiology*, vol. 2. Wiley, New York, N.Y.
76. Zinder, S. H. 1993. Physiological ecology of methanogens, p. 128–206. *In* J. G. Ferry (ed.), *Methanogenesis: ecology, physiology, biochemistry & genetics*. Chapman & Hall, New York, N.Y.

Anhang B

Environmental Microbiology (submitted)**Thermophilic Methanogens in Rice Field Soil**

Axel Fey, Kuk Jeong Chin and Ralf Conrad

Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie, Karl-von-Frisch-Str., 35043 Marburg

Running title: Thermophilic methanogens in rice field soil

Key words: Methane production, Temperature, Paddy soil, SSU rRNA, Terminal restriction length polymorphism

Corresponding author:

Ralf Conrad

Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie

Karl-von-Frisch-Str.

35043 Marburg, Germany

Tel: +49-6421-178 801

Fax: +49-6421-178 809

Email: Conrad@mail.uni-marburg.de

Summary

The soil temperature in flooded Italian rice fields generally is lower than 30°C. However, two temperature optima at approximately 41°C and 50°C were found when soil slurries were anoxically incubated at a temperature range of 10 to 80°C. The second temperature optimum indicates the presence of thermophilic methanogens in the rice field soil. Experiments with ¹⁴C-labeled bicarbonate showed that the thermophilic CH₄ was exclusively produced from H₂/CO₂. Terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) of archaeal SSU rRNA gene fragments revealed a dramatic change in the archaeal community structure at temperatures >37°C with the euryarchaeotal Rice cluster I becoming the dominant group (about 80%). A clone library of archaeal SSU rRNA gene fragments generated at 49°C was also dominated (10 out of 11 clones) by Rice cluster I. Our results demonstrate that Italian rice field soil contains thermophilic methanogenic activity which was most probably due to the members of the yet uncultivated euryarchaeotal Rice cluster I.

Introduction

Usually, thermophilic or hyperthermophilic microorganisms have been isolated from hot environments, e.g. geothermal and hydrothermal habitats (Kristjansson and Stetter, 1992; Stetter, 1996), petroleum reservoirs (oil fields) (Orphan et al., 2000; Ng et al., 1989; Rozanova et al., 1988), hydrothermal vents in freshwater lakes and ocean sediments (Elsgaard et al., 1994a,b; Jørgensen et al., 1992; Jeanthon, 2000; Sievert et al., 2000), or microbial mats of solfataric fields and hot springs (Skirnisdottir et al., 2000; Barns et al., 1994). Thermophilic granular sludge is another well-studied environment (Sekiguchi et al., 1998; Van Lier et al., 1996). In contrast to all these studies, the existence of thermophilic microorganisms in cold or temperate environments has not received much attention. Nevertheless, thermophiles seem to also exist in permanently cold environments. For example thermophilic sulfate reducers were isolated from cold marine sediments (Isaksen et al., 1994). The thermophilic H₂-oxidizing *Bacillus schlegelii* was found in ice samples and cold lake sediments (Bonjour et al., 1988). Nozhevnikova et al. (1997) demonstrated thermophilic CH₄ production with an temperature range of up to 70°C and an optimum at about 50°C in deep cold lakes.

Rice field soils are an important source in the budget of atmospheric CH₄ (IPCC, 1992; Cole et al., 1996). Rice field soils have a relatively low temperature regime (about 15-30°C; Schütz et al., 1990). Nevertheless, thermophilic methanogens seem to be present in these soils. Yang and Chang (1998) detected two temperature optima for methane production in rice field soils from Taiwan at 37 and 60°C. Yao and Conrad (2000a) examined four different rice field soils from the Philippines and Italy. In all these soils they found a second temperature optimum at $\geq 50^\circ\text{C}$. In both studies, the second temperature optimum developed after prolonged incubation time indicating the development of a resident flora of thermophilic methanogens. Despite this obviously widespread existence of thermophilic methanogenesis in rice field soils, the pathway of CH₄ production and the contributing methanogens are still unknown.

There have been many attempts to get insight into what type of methanogenic archaea are present in rice field soil (Reichardt et al., 1997; Kudo et al., 1997; Joulain et al., 1998). Clone libraries of 16S rRNA genes retrieved from Italian rice field soil revealed several novel phylogenetic lineages (Großkopf et al., 1998a,b; Chin et al., 1999; Lueders and Friedrich, 2000). Besides the families of *Methanobacteriaceae*, *Methanomicrobiaceae*, *Methanosaetaceae* and *Methanosarcinaceae*, the euryarchaeotal Rice cluster I and Rice cluster II which are apparently methanogenic (Lehmann-Richter et al., 1999; Lueders et al., 2001), the euryarchaeotal Rice cluster III and Rice cluster V which are probably non-methanogenic, and the crenarchaeotal Rice cluster IV and Rice cluster VI have been detected.

Recently, T-RFLP analysis was developed as a rapid PCR-based screening method (Liu et al., 1997) and successfully applied to rice field soil (Fey and Conrad 2000; Chin et al., 1999; Lueders and Friedrich, 2000; Ramakrishnan et al., 2000; Lueders et al., 2001). This method does not only provide information about the diversity (species richness) but also the relative abundance of the different T-RFs (species evenness), which makes it a powerful tool for the analysis of microbial communities (Liu et al., 1997; Osborn et al., 2000).

The aim of our study was to examine the effect of temperature in an Italian rice field soil on CH₄ production, on the methanogenic precursors and pathway of CH₄ production, and to characterise the composition of the methanogenic community by cloning/sequencing and T-RFLP analysis.

Results

Methane production and methanogenic substrates

Anoxic incubation of soil slurries from Italian rice field resulted in the production of CH₄ after a lag phase of 2 days. After 12 days, a distinct temperature optimum for CH₄ production was found at 41-42°C (Fig. 1). Higher temperatures resulted in a sharp decrease of CH₄ production with no activity at temperatures >50°C. After 33 days, the picture had completely changed. A second temperature optimum showed up at about 50°C (Fig. 1), indicating the existence of thermophilic methanogens. This second temperature optimum started to develop after a lag phase of 20 days (data not shown). Between the two temperature optima at 41 and 50°C the rates of CH₄ production were still low after 33 days of incubation, but increased after 89 days. Then, CH₄ production exhibited a broad optimum between 40 and 50°C (Fig. 1). However, at temperatures ≥ 60°C no CH₄ production was observed. Production of CO₂, in contrast, occurred at all temperatures up to about 74°C, and totally stopped at about 80°C (data not shown).

After 89 days of incubation, the concentrations of the methanogenic precursors H₂ and acetate had reached constant values indicating quasi steady state of production and consumption reactions (Yao and Conrad, 1999; 2000b; Fey and Conrad 2000). The steady state H₂ partial pressures increased with temperature from about 0.5 Pa at 10°C to about 5.5 Pa at 50°C (Fig. 2). At higher temperature, the H₂ partial pressures strongly increased up to about 350 Pa at 70°C and then rapidly decreased again. At 80°C, H₂ was no longer detectable. The acetate steady state concentrations in the pore water were very low (<10 μM) up to the first temperature optimum of CH₄ production (41°C; Fig. 3). At higher temperatures, the acetate concentrations increased reaching about 200 μM at the second temperature optimum (50°C) of CH₄ production. At temperatures >50°C, acetate increased even more strongly and accumulated up to 25 mM at 70°C. Simultaneously, propionate, which was not detected (i.e. <5 μM) at lower temperatures, accumulated up to 4 mM. Accumulation ceased at temperatures >70°C, and both intermediates were no longer detected at >75°C.

The accumulation of the methanogenic precursor substrates H₂ and acetate was not the rate-limiting step in the development of the second temperature optimum of CH₄ production at 50°C, since incubation of anoxic soil slurries after addition of an excess of H₂/CO₂ still showed a lag phase that was much longer (7 versus 2 days) at 50 versus 37°C.

At 50°C the actual concentrations of substrates and products resulted under steady state conditions in ΔG values for hydrogenotrophic and acetoclastic methanogenesis of $-15 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ CH}_4$ and $-27 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ CH}_4$, respectively. Addition of ^{14}C -labeled bicarbonate to soil slurries resulted in the production of $^{14}\text{CH}_4$ which had a similar specific radioactivity as the $^{14}\text{CO}_2$ in equilibrium with the radioactive bicarbonate. We estimated that $105 \pm 14 \%$ of the produced CH_4 originated from reduction of CO_2 , presumably with H_2 as electron donor. The recovery of ^{14}C was 85%.

Archaeal community

To get insight into the structure of the methanogenic archaeal community, DNA was extracted from soil slurries incubated at 4 different temperatures between 37 and 50°C, and T-RFLP analysis was performed. A typical T-RFLP pattern of the archaeal SSU rRNA genes amplified from total community DNA extracted from soil slurry at 37°C is shown in Fig.4. The marked fragments (T-RFs) correspond to phylogenetic lineages that were characterized by cloning and sequencing (for details see: Chin et al., 1999; Lueders and Friedrich, 2000). The relative frequency of the individual T-RFs among the total archaeal community was determined from the relative peak areas using all peaks $\geq 1 \%$ of the total peak area.

The T-RFLP-pattern of SSU rDNA showed an abundance of the euryarchaeotal Rice cluster I of about 20% at 37°C (Fig.5). However, higher incubation temperatures increased this abundance to 40% at 41°C (the first temperature optimum) and 80% at 45 and 49°C. The acetoclastic methanogenic *Methanosaetaceae* and the euryarchaeotal Rice cluster III were no longer detected at temperatures which were higher than the first temperature optimum (41°C). At 45 and 49°C, only *Methanosarcinaceae*, the crenarchaeotal Rice cluster IV and a very low abundance (<1%) of *Methanobacteriaceae* and *Methanomicrobiaceae* were detected besides Rice cluster I.

The quantification of the different archaea can be biased since some of the T-RFs can come from more than one phylogenetic lineage. For example, the T-RFs of *Methanosarcinaceae* are also characteristic for Rice cluster VI (Lueders and Friedrich, 2000). However, the other T-RFs are rather specific for a phylogenetic group among clones from Italian rice field soil. The T-RF characteristic for Rice cluster I, for example, has only rarely been found among clones of Rice cluster II, Rice cluster IV and *Methanobacteriaceae* (Lueders and Friedrich, 2000). Nevertheless, an archaeal clone

library of SSU rDNA was constructed from a slurry sample incubated at 49°C. From this clone library 11 clones were randomly picked and sequenced. Ten clones fell into the Rice cluster I, and only one clone belonged to Rice cluster IV (Fig.6). This result confirms that of the T-RFLP pattern showing the dominance of Rice cluster I at 49°C.

Discussion

The observed second temperature optimum of CH₄ production at 50°C indicates that thermophilic methanogens were present in rice field soil. This finding confirms earlier studies in which thermophilic methane production in different rice field soils was observed (Yao and Conrad, 2000a; Yang and Chang, 1998), showing that thermophilic methanogens might be widespread in different soil habitats.

The first temperature optimum was found at 41°C, which is well above the in situ temperature range (15-30°C; Schütz et al., 1990). Similar high temperature optima were found in sediments of Lake Mendota (Zeikus and Winfrey, 1976), Lake Constance (Thebrath, 1991) and other deep lakes (Nozhevnikova et al., 1997), which all exhibit a constant low (<10°C) temperature. A high temperature optimum was also found in a granular sludge bed reactor for psychrophilic wastewater treatment (Lettinga et al., 1999). Thus the temperature optimum reflects the optimum of the methanogenic microbial community rather than the real in situ conditions.

Thermophilic CH₄ production at temperatures higher than the first temperature optimum started after a prolonged lag phase of about 20 days at 50°C compared to 2 days at 41°C. A lag phase before start of the thermophilic CH₄ production was also observed in the sediments of deep freshwater lakes (Kimura et al., 1993; Nozhevnikova et al., 1997) and in other rice field soils (Yang and Chang, 1998; Yao and Conrad, 2000a). The observed lag phase was not due to the on-going reduction of ferric iron or sulfate such as reported by Yao and Conrad (2000a), as the soil had been preincubated at 30°C until it became methanogenic. Instead, the lag phase is most likely explained by growth of a small thermophilic methanogenic population present in the habitat. This population was limited by the low temperature rather than the supply of substrate as shown by the observation that addition of excess substrate still caused a lag phase that was longer than that for the development of CH₄ production at mesophilic temperatures.

For supply of methanogenic precursors, e.g. H₂, CO₂ and acetate, during long incubation periods the presence of active fermenting bacteria is necessary. In our

experiments we showed that these bacteria were active up to temperatures of about 75-80°C, because fermentation products (H₂, acetate, propionate) accumulated when the incubation temperature exceeded the upper temperature limit (i.e. 60°C) of CH₄ production. Obviously, thermophilic fermenting bacteria were also present in the rice field soil.

Acetate and H₂/CO₂ should theoretically contribute ≥66% and ≤33% to the total CH₄ production, respectively, when polysaccharides are anaerobically degraded (Conrad, 1999). Indeed such contributions were observed in mesophilically incubated rice field soil (Fey and Conrad, 2000; Yao and Conrad, 2000b). At thermophilic temperatures, however, the substrate for CH₄ production was found to be exclusively H₂/CO₂. Acetate accumulated at temperatures >41°C confirming that it was no longer adequately consumed. At first glance this might be surprising, because the thermodynamic properties were much more favourable for acetoclastic than for hydrogenotrophic methanogenesis. The calculated ΔG of -15 kJ mol⁻¹ CH₄ formed from H₂/CO₂ was much higher (less exergonic) than usually observed (-23 kJ mol⁻¹ CH₄) in methanogenic rice field soils (Yao and Conrad, 1999), indicating that methanogenesis operated at the thermodynamic threshold. However, similarly high ΔG values were found in a few other methanogenic environments (Westermann, 1994), and obviously also allowed H₂/CO₂-dependent methanogenesis in our rice field soil at 50°C. However, the absence of acetoclastic methanogenesis at this temperature can not be explained by thermodynamics. Instead we conclude that it was due to the composition of the methanogenic populations.

The T-RFLP pattern which we obtained at 37°C was quite similar to the results published earlier (Fey and Conrad, 2000; Lueders and Friedrich, 2000; Chin et al., 1999). However, the abundance of Rice cluster I increased dramatically with increasing incubation temperature, and in parallel the contribution of the methanogenic substrate H₂/CO₂ to total CH₄ production changed from about 35% at 37°C (Fey and Conrad, 2000) to about 100% at 50°C. In conclusion, it seems that Rice cluster I methanogens were responsible for thermophilic CH₄ production and utilised H₂/CO₂ as substrate. This conclusion is consistent with the observation that rice roots, which are populated by Rice cluster I methanogens (Großkopf et al., 1998b), also produce CH₄ predominantly from H₂/CO₂ (Lehmann-Richter et al., 1999).

The origin of thermophilic methanogens and fermenting bacteria in psychrophilic or mesophilic habitats remains unclear. However, input of microorganisms via air from volcanic or geothermic/hydrothermic habitats might be a possibility (Bonjour et al. 1988).

Vorobyova et al. (1997) report high numbers of viable microorganisms in permafrost, including thermophiles. Thermophiles are often able to survive for long times under low temperature without being active (reviewed in Stetter, 1996). The existence of thermophilic methanogens in our study might be explained by this ability. On the other hand, some thermophiles have a large temperature range and might therefore be able to slowly grow at mesophilic temperatures (Wiegel, 1990). The minimum temperature required for growth of thermophiles is usually 15 to 25°C lower than their temperature optimum (Kristjansson and Stetter, 1992). According to this characteristic the thermophilic methanogens in our study may just be able to slowly grow at temperatures $\geq 30^\circ\text{C}$, which is close to the highest in situ temperatures in Italian rice field soil (Schütz et al., 1990). For *Methanobacterium thermoautotrophicum* an even larger temperature range of about 55°C was observed (22 – 78°C; Wiegel, 1990), and it is argued that this might be the reason why *M. thermoautotrophicum* is so widespread in mesophilic environments (Aragno, 1981; Zeikus, 1979). A large temperature range was also observed for other microorganisms (Wiegel, 1990). The yet uncultivated methanogens of Rice cluster I seem to make up a significant percentage of the total methanogenic populations in Italian rice field soil over a large temperature range of 10 to 37°C (Fey and Conrad, 2000). Here, we have shown that they become even dominant at 50°C. It is likely that psychrophilic, mesophilic and thermophilic populations of Rice cluster I methanogens exist in rice field soil. However, the temperature ranges of individual populations of Rice cluster I methanogens will only be known if isolates become available.

Experimental procedures

Soil samples

The soil samples were collected in March 1998 (after ploughing) from the yet unflooded rice fields of the Italian Rice Research Institute in Vercelli, Italy. The soil was air-dried and stored as dry lumps at room temperature. It was a sandy-loamy silt (27% sand, 58% silt, 15% clay). The dry lumps were broken and passed through a stainless steel sieve (2 mm). For preparation of slurries the soil samples were suspended at a weight ratio of 1:1 in distilled anoxic sterile water.

Incubation of soil slurries in the temperature gradient block

To study temperature effects at high resolution, soil slurries were incubated in a temperature gradient block, made from aluminum (length: 185 cm), heated at the one end and cooled at the other end (Isaksen et al., 1994; Arnosti et al., 1998). The block contained 4 rows each with 31 holes into which test tubes with soil slurries were fitted. Test tubes (16 ml) were filled with 3 g dry weight (d.w.) soil and 3 ml anoxic water, closed with black butyl rubber stoppers and flushed with N₂. To obtain methanogenic conditions, the samples were preincubated for 2 days at 30°C. Thereafter, they were put into the temperature gradient block which was kept at a range of 10-80°C in intervals of 1 to 2.6°C (4 replicates). The concentrations of CH₄, CO₂ and H₂ in the gas headspace were determined weekly after the tubes were vigorously shaken for 30 s by hand to reach equilibration of the gas and liquid phase. At the end of incubation (after 89-127 days), liquid samples were taken for the analysis of fatty acids. Before sampling the bottles were briefly mixed on a vortex mixer

Incubation with excess substrate

Soil slurries were prepared as described above, using 120-ml serum bottles which were filled with 20 g d.w. Soil and 20 ml anoxic water, closed with butyl rubber stoppers and flushed with H₂/CO₂ (8:2). The samples were preincubated at 30°C for 2 days. Further incubation was done 37 and 50°C (3 replicates each), and CH₄ production was measured frequently.

Radioactive experiment

Soil slurries for the radioactive experiment were prepared analogously, using 60-ml serum bottles which were filled with 10 g d.w. soil and 10 ml anoxic water, closed with butyl rubber stoppers and flushed with N₂. The bottles were then preincubated at 50°C for 82 days to reach quasi-steady state conditions. For the experiment the serum bottles were evacuated for several minutes and then at least 6 times flushed with N₂ and evacuated to remove all CH₄ and CO₂. Finally, the bottles were filled with N₂ to a pressure of 1.2 bar. To start the experiment, ca. 50 kBq of NaH¹⁴CO₃ (Amersham, Braunschweig; 2 GBq mmol⁻¹) was added (4 replicates) and labelled as well as unlabelled CH₄ and CO₂ in the headspace were measured 5 times over 2 weeks. The fraction of CH₄ produced from

H_2/CO_2 (f_{H_2/CO_2}) was determined from the specific radioactivities of CH_4 (SR_{CH_4}) and CO_2 (SR_{CO_2}) in the headspace of the bottles: $f_{H_2/CO_2} = SR_{CH_4} / SR_{CO_2}$ (Conrad and Schütz, 1988; Conrad et al., 1989).

Analytical techniques

CH_4 and CO_2 were analysed by gas chromatography using a flame ionisation detector (Shimadzu, Kyoto, Japan). CO_2 was measured after conversion to CH_4 with a methaniser (Ni-catalyst at $350^\circ C$, Chrompack, Middelburg, The Netherlands). H_2 was analysed by gas chromatography using a HgO-to-Hg-conversion detector (RGD2, Trace Analytical, Stanford, USA) (Cord-Ruwisch et al., 1988). $^{14}CH_4$ and $^{14}CO_2$ were measured in a gas chromatograph equipped with a methaniser, a flame ionisation detector and a RAGA radioactivity gas proportional counter (Raytest, Straubenhardt, Germany) (Conrad et al., 1989).

Liquid samples were transferred into 2-ml Eppendorf cups. The samples were centrifuged for 15 min. ($12,000\text{ g}$; $4^\circ C$), and the supernatant was stored frozen at $-26^\circ C$ until analysis. Before analysis the thawed samples were again centrifuged (15 min.) and filtered through $0.2\text{-}\mu\text{m}$ membrane filters (Minisart SRP 15, Sartorius, Göttingen, Germany). Fatty acids were measured by HPLC (Sykam, Gilching, Germany) with a refraction index detector, having a detection limit of $3\text{-}5\ \mu\text{M}$ (Krumböck and Conrad, 1991). The pH of soil slurry samples was measured previously to centrifugation and filtration using a glass electrode.

Thermodynamic calculations

Gibbs free energy changes (ΔG) were calculated from the standard Gibbs free energy changes (ΔG^0), the concentrations of products and substrates at steady state as described earlier (Conrad et al., 1986). Values of ΔG^0 of the reactions were calculated from the standard Gibbs free energies of formation (G_f^0) of the reactants and products (Thauer et al., 1977), and were corrected for the actual temperature (T) by the Van't Hoff equation (Conrad and Wetter, 1990). The standard reaction enthalpy changes (ΔH^0) were calculated from the enthalpies of formation (H_f^0) of the reactants and products (Lange, 1979).

DNA-Extraction from soil slurries

The samples for molecular analysis were taken from soil slurries that had been incubated for 89 days at 37, 41, 45 and 49°C in the temperature gradient block (3 replicates). The extraction procedure was a modification of previously described protocols (Ogram et al., 1987; Smalla et al., 1993; Großkopf et al., 1998a; Chin et al., 1999). A slurry sample (1 ml) was mixed with 0.5 ml sodium phosphate buffer (pH 8.0; 120 mM), 200 µl sodium dodecyl sulfate (10%) and 1 g of glass beads (0.17 to 0.18 mm in diameter). After incubation (10 min., 65°C) and two 1-min cycles of bead-beating (Mini-Bead-Beater; Biospec Products, Bartlesville, Okla.) the slurry was centrifuged (10 min; 13,000 × g). The DNA was extracted from the supernatant using chloroform-isoamyl alcohol (24:1 [vol/vol]) and the extracts were precipitated with 0.1 volume sodium acetate (3 M, pH 5.3) and 2 volumes ethanol, and purified with caesium chloride as described elsewhere (Smalla et al., 1993).

Amplification of archaeal SSU rRNA gene fragments

The SSU rDNA fraction of the DNA samples was amplified by PCR with the archaeal-specific primers described by Großkopf et al. (1998a), which amplifies from position 109 to 934 (*Escherichia coli* 16S rRNA numbering (Brosius et al., 1978) as described previously (Chin et al., 1999). The thermal profile used for amplification of slurry-DNA included 20 (for cloning, see below) and 28 (for T-RFLP) cycles of denaturation (30 s), primer annealing at 52°C (1 min) and elongation at 72°C (2 min).

T-RFLP analysis

The principle of the T-RFLP analysis has been described by Liu et al. (1997). The reverse primer was labelled 5'-terminally with FAM (5-carboxyfluorescein) for T-RFLP analysis. Aliquots of the purified SSU rDNA amplicons were digested with Taq I (Promega, Mannheim, Germany) and subsequent T-RFLP analysis was performed as described before (Chin et al., 1999).

Cloning, sequencing and phylogenetic analysis

Clone libraries of the amplified archaeal SSU rDNA were constructed using the DNA extracts from the soil slurries incubated at 49°C as described before (Chin et al., 1999). Eleven clones of the clone library were randomly selected and sequence analysis was carried out as described before (Chin et al., 1999). The phylogenetic analysis of sequence data was carried out using the ARB software package and its database (Strunk and Ludwig, 1996) as described before (Chin et al., 1999). Phylogenetic placement was done in comparison to reference sequences for the main lines of descent within the archaeal kingdom *Euryarchaeota* and *Crenarchaeota* (Woese et al., 1990), as well as *Korarchaeota* (Barns et al., 1996). The tree topology was evaluated by performing neighbour-joining analysis (Saitou and Nei, 1987). The statistical significance of interior nodes was tested by bootstrap analysis by the neighbour-joining method (ARB; 1,000 data resampling).

Accession numbers

The sequences of the environmental slurry SSU rDNA clones obtained in this study have been deposited in the EMBL, GenBank and DDBJ nucleotide sequence databases under the following accession numbers: clones RSS50 to RSS50-11, **XXXX to XXXX**.

Acknowledgements

We thank the Fonds der Chemischen Industrie for financial support.

References

- Aragno, M. (1981) Responses of microorganisms to temperature. In *Encyclopedia of plant physiology*. Lange, O.L., Nobel, P.S., Osmand, C.B., and Ziegler, H. (eds). Heidelberg: Springer, pp. 339-369.
- Arnosti, C., Jørgensen, B.B. Sagemann, J., and Thamdrup, B. (1998) Temperature dependence of microbial degradation of organic matter in marine sediments. *Mar Ecol Prog Ser* **165**: 59-70.
- Barns, S.M., Delwiche, C.F., Palmer, J.D., and Pace, N.R. (1996) Perspectives on archaeal diversity, thermophily and monophyly from environmental rRNA sequences. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 9188-9193.
- Barns, S.M., Fundyga, R.E., Jeffries, M.W., and Pace, N.R. (1994) Remarkable archaeal diversity detected in a Yellowstone National Park hot spring environment. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 1609-1613.
- Bonjour, F., Graber, A., and Aragno, M. (1988) Isolation of *Bacillus schlegelii*, a thermophilic, hydrogen oxidizing, aerobic autotroph, from geothermal and nongeothermal environments. *Microb Ecol* **16**: 331-337.
- Brosius, J., Palmer, M.L., Kennedy, P. J., and H. R. Noller (1978) Complete nucleotide sequence of a 16S ribosomal RNA gene from *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* **75**: 4801-4805.
- Chin, K.J., Lukow, T., and Conrad, R. (1999) Effect of temperature on structure and function of the methanogenic archaeal community in an anoxic rice field soil. *Appl Environ Microbiol* **65**: 2341-2349.
- Cole, C.V., Cerri, C., Minami, K., Mosier, A., Rosenberg, N., Sauerbeck, D. et al. (1996) Agricultural options for mitigation of greenhouse gas emissions. In *Climate Change 1995. Impacts, adaptations and mitigation of climate change: scientific-technical analyses*. Watson, R.T., Zinyowera, M.C., and Moss, R.H. (eds). Published for the Intergovernmental Panel on Climate Change. Cambridge University Press, Cambridge. pp. 745-771.
- Conrad, R. (1999) Contribution of hydrogen to methane production and control of hydrogen concentrations in methanogenic soils and sediments. *FEMS Microbiol Ecol* **28**:193-202.

- Conrad, R., and Schütz, H. (1988) Methods of studying methanogenic activities in aquatic environments. In *Methods in aquatic bacteriology* Austin, B. (ed). Wiley, Chichester. pp. 301-343.
- Conrad, R., and Wetter, B. (1990) Influence of temperature on energetics of hydrogen metabolism in homoacetogenic, methanogenic, and other anaerobic bacteria. *Arch Microbiol* **155**: 94-98.
- Conrad, R., Mayer, H.-P., and Wüst, M. (1989) Temporal change of gas metabolism by hydrogen-syntrophic methanogenic bacterial associations in anoxic paddy soil. *FEMS Microbiol Ecol* **62**: 265-274.
- Cord-Ruwisch, R., Seitz, H.-J., and Conrad, R. (1988) The capacity of hydrogenotrophic anaerobic bacteria to compete for traces of hydrogen depends on the redox potential of the terminal electron acceptor. *Arch Microbiol* **149**: 350-357.
- Elsgaard, L., Isaksen, M.F., Joergensen, B.B., Alayse, A.M., and Jannasch, H.W. (1994a) Microbial sulfate reduction in deep-sea sediments at the Guaymas basin - hydrothermal vent area - influence of temperature and substrates. *Geochim Cosmochim Acta* **58**: 3335-3343.
- Elsgaard, L., Prieur, D., Mukwaya, G.M., and Joergensen, B.B. (1994b) Thermophilic sulfate reduction in hydrothermal sediment of Lake Tanganyika, East Africa. *Appl Environ Microbiol* **60**: 1473-1480.
- Fey, A. and Conrad, R. (2000) The effect of temperature on carbon and electron flow and on the archaeal community in methanogenic rice field soil. *Appl Environ Microbiol* **66**: 4790-4797.
- Großkopf, R., Janssen, P.H., and Liesack, W. (1998a) Diversity and structure of the methanogenic community in anoxic paddy soil microcosms as examined by cultivation and direct 16S rRNA gene sequence retrieval. *Appl Environ Microbiol* **64**: 960-969.
- Großkopf, R., Stubner, S., and Liesack, W. (1998b) Novel euryarchaeotal lineages detected on rice roots and in the anoxic bulk soil of flooded rice microcosms. *Appl Environ Microbiol* **64**: 4983-4989.
- IPCC (1992) Climate Change 1992. The Supplementary Report to the IPCC Scientific Assessment.
- Isaksen, M. F., Bak, F., and Jørgensen, B.B. (1994) Thermophilic sulfate-reducing bacteria in cold marine sediment. *FEMS Microbiol Ecol* **14**: 1-8.
- Jeanthon, C. (2000) Molecular ecology of hydrothermal vent microbial communities. *Ant V Leeuwenhoek* **77**: 117-133.

- Joergensen B.B., Isaksen M.F., Jannasch H.W. (1992) Bacterial sulfate reduction above 100 °C in deep-sea hydrothermal vent sediments. *Science* **258**: 1756-1757.
- Joulain, C., Ollivier, B., Patel, B.K.C., and Roger, P.A. (1998) Phenotypic and phylogenetic characterization of dominant culturable methanogens isolated from ricefield soils. *FEMS Microbiol Ecol* **25**: 135-145.
- Kimura, M., Minoda, T., and Murase, J. (1993) Water-soluble organic materials in paddy soil ecosystem. *Soil Sci Plant Nutr* **39**: 713-724.
- Kristjansson, J.K., and Stetter, K.O. (1992) Thermophilic bacteria. In *Thermophilic bacteria*. Kristjansson, J.K. (ed). Boca Raton: CRC Press, Inc., pp. 1-18.
- Krummboeck, M., and Conrad, R. (1991) Metabolism of position 1a: belled glucose in anoxic -methanogenic paddy soil and lake sediment. *FEMS Microbiol Ecol* **85**: 247-256.
- Kudo, Y., Nakajima, T., Miyaki, T., and Oyaizu, H. (1997) Methanogen flora of paddy soils in Japan. *FEMS Microbiol Ecol* **22**: 39-48.
- Lange, N.A. (1979) Handbook of chemistry. New York: McGraw-Hill.
- Lehmann-Richter, S., Großkopf, R., Liesack, W., Frenzel, P., and Conrad, R. (1999) Methanogenic archaea and CO₂-dependent methanogenesis on washed rice roots. *Environ Microbiol* **1**: 159-166.
- Lettinga G., Rebac, S., Parshina, S., Nozhevnikova, A., van Lier, J.B., and Stams, A.J.M. (1999) High-rate anaerobic treatment of wastewater at low temperatures. *Appl Environ Microbiol* **65**: 1696-1702.
- Liu, W.-T., Marsh, T. L., Cheng, H., and Forney, L. J. (1997) Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol* **63**: 4516-4522.
- Lueders, T., and Friedrich, M. (2000) Archaeal population dynamics during sequential reduction processes in rice field soil. *Appl Environ Microbiol* **66**: 2732-2742.
- Lueders, T., Chin, K.J., Conrad, R., and Friedrich, M. (2001) Molecular analyses of methyl-coenzyme M reductase α -subunit (*mcrA*) genes in rice field soil and enrichment cultures reveal the methanogenic phenotype of a novel archaeal lineage. *Environ Microbiol* **In Press**.
- Ng, T.K., Weimer, P.J., and Gawel, L.J. (1989) Possible nonanthropogenic origin of two methanogenic isolates from oil-producing wells in San Miquelito field, Ventura County, California. *Geomicrobiol J* **7**: 185-192.

- Nozhevnikova, A.N., Holliger, C., Ammann, A., and Zehnder, A.J.B. (1997) Methanogenesis in sediments from deep lakes at different temperatures (12-70°C). *Water Sci Tech* **36**: 57-64.
- Ogram, A., Sayler, G. S., and Barkay, T. (1987) The extraction and purification of microbial DNA from sediments. *J Microbiol Methods* **7**: 57-66.
- Orphan, V.J., Taylor, L.T., Hafenbradl, D., and DeLong, E.F. (2000) Culture-dependent and culture-independent characterization of microbial assemblages associated with high temperature petroleum reservoirs. *Appl Environ Microbiol* **66**: 700-711.
- Osborn, A.M., Moore, E.R.B., and Timmis, K.N. (2000) An evaluation of terminal-restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis for the study of microbial community structure and dynamics. *Environ Microbiol* **2**: 39-50.
- Ramakrishnan, B., Lueders, T., Conrad, R., and Friedrich, M. (2000) Effect of soil aggregate size on methanogenesis and archaeal community structure in anoxic rice field soil. *FEMS Microbiol Ecol* **32**: 261-270.
- Reichardt, W., Mascarina, G., Padre, B., and Doll, J. (1997) Microbial communities of continuously cropped, irrigated rice fields. *Appl Environ Microbiol* **63**: 233-238.
- Rozanova, E.P., Nazina, T.N., and Galushko, A.S. (1988) Isolation of a new genus of sulfate-reducing bacteria and description of a new species of this genus, *Desulfomicrobium apsphaerum* gen. nov., sp. nov. *Microbiology* **57**: 514-520.
- Saitou, N., and Nei, M. (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol* **4**: 406-425.
- Schütz, H., Seiler, W., and Conrad, R. (1990) Influence of soil temperature on methane emission from rice paddy fields. *Biogeochem* **11**: 77-95.
- Sekiguchi, Y., Kamagata, Y., Syutsubo, K., Ohashi, A., Harada, H., and Nakamura, K. (1998) Phylogenetic diversity of mesophilic and thermophilic granular sludges determined by 16S rRNA gene analysis. *Microbiology - UK* **144**: 2655-2665.
- Sievert, S.M., Kuever, J., and Muyzer, G. (2000) Identification of 16S ribosomal DNA-defined bacterial populations at a shallow submarine hydrothermal vent near Milos Island (Greece). *Appl Environ Microbiol* **66**: 3102-3109.
- Skirnisdottir, S., Hreggvidsson, G.O., Hjörleifsdottir, S., Martinsson, V.T., Petursdottir, S.K., Holst, O. and Kristjansson, J.K. (2000) Influence of sulfide and temperature on species composition and community structure of hot spring microbial mats. *Appl Environ Microbiol* **66**: 2835-2841.

- Smalla, K., Cresswell, N., Mendonca-Hagler, L.C., Wolters, A., and van Elsas, J.D. (1993) Rapid DNA extraction protocol from soil for polymerase chain reaction-mediated amplification. *J Appl Bacteriol* **74**: 78-85.
- Stetter, K.O. (1996) Hyperthermophilic procaryotes. *FEMS Microbiol Rev* **18**: 149-158.
- Strunk, O. and Ludwig, W. (1996) ARB: a software environment for sequence data. [WWW document]. URL <http://www.biol.chemie.tu-muenchen.de/pup/ARB/>. Technische Universität München, München.
- Thauer, R.K., Jungermann, K., and Decker, K. (1977) Energy conservation in chemotrophic anaerobic bacteria. *Bacteriol Rev* **41**: 100-180.
- Thebrath, B. (1991) *Bildung, Oxidation und Emission von Methan sowie anaerobe Stoffumsätze in limnischen Standorten*. Konstanz: Hartung-Gorre-Verlag.
- VanLier, J.B., Martin, J.L.S., and Lettinga, G. (1996) Effect of temperature on the anaerobic thermophilic conversion of volatile fatty acids by dispersed and granular sludge. *Water Res* **30**: 199-207.
- Vorobyova, E., Soina, V., Gorlenko, M., Minkovakaya, N., Zalinova, N., Mamukelashvili, A. et al. (1997) The deep cold biosphere: facts and hypothesis. *FEMS Microbiol Rev* **20**: 277-290.
- Westermann, P. (1994) The effect of incubation temperature on steady-state concentrations of hydrogen and volatile fatty acids during anaerobic degradation in slurries from wetland sediment. *FEMS Microbiol Ecol* **13**: 295-302.
- Wiegel, J. (1990) Temperature spans for growth: hypothesis and discussion. *FEMS Microbiol Rev* **75**: 155-170.
- Woese, C.R., Kandler, O., and Wheelis, M.L. (1990) Towards a natural system of organisms: proposal for the domains *Archaea*, *Bacteria*, and *Eucaria*. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 4576-4579.
- Yang, S.-S., and Chang, H.-L. (1998) Effect of environmental conditions on methane production and emission from paddy soil. *Agric Ecosys Environ* **69**: 69-80.
- Yao, H., and Conrad, R. (1999) Thermodynamics of methane production in different rice paddy soils from China, the Philippines and Italy. *Soil Biol Biochem* **31**: 463-473.
- Yao, H., and Conrad, R. (2000a) Effect of temperature on reduction of iron and production of carbon dioxide and methane in anoxic wetland rice soils. *Biol Fertil Soils* **32**: 135-141.
- Yao, H., and Conrad, R. (2000b) Electron balance during steady state production of CH₄ and CO₂ in anoxic rice soil. *Eur J Soil Sci* **51**: 369-378.

Zeikus J.G., Winfrey M.R. (1976) Temperature limitation of methanogenesis in aquatic sediments. *Appl Environ Microbiol* **31**: 99-107.

Zeikus, J.G. (1979) Thermophilic bacteria: ecology, physiology and technology. *Enz Microbiol Tech* 1: 243-252.

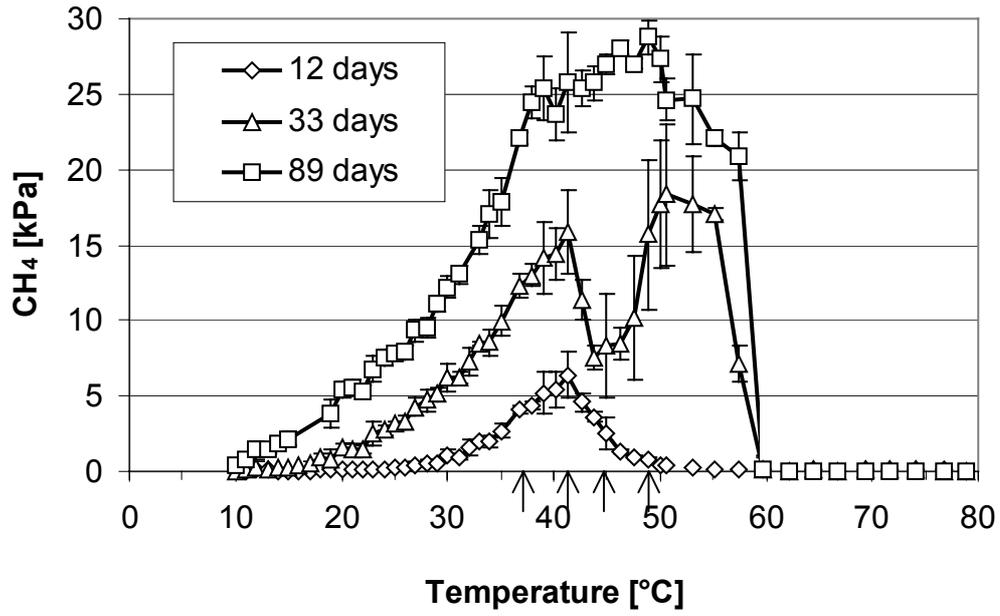


Fig.1: Methane partial pressures in anaerobically incubated rice field soil after 12, 33 and 89 days incubation from 10 to 80°C. Mean \pm SD of $n=4$. Arrows indicate the samples used for DNA-extraction and T-RFLP analyses.

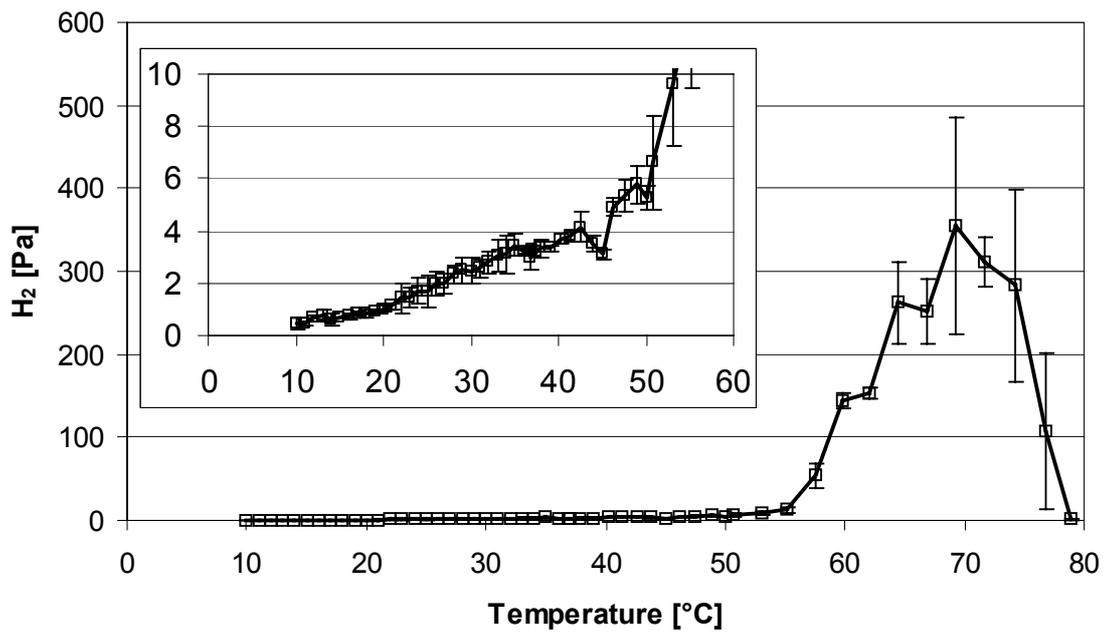


Fig.2: Hydrogen partial pressure in the gas phase of anaerobically incubated rice field soil after 89 days of incubation. The insert shows part of the curve at a different scale.

Means \pm SD of n=4.

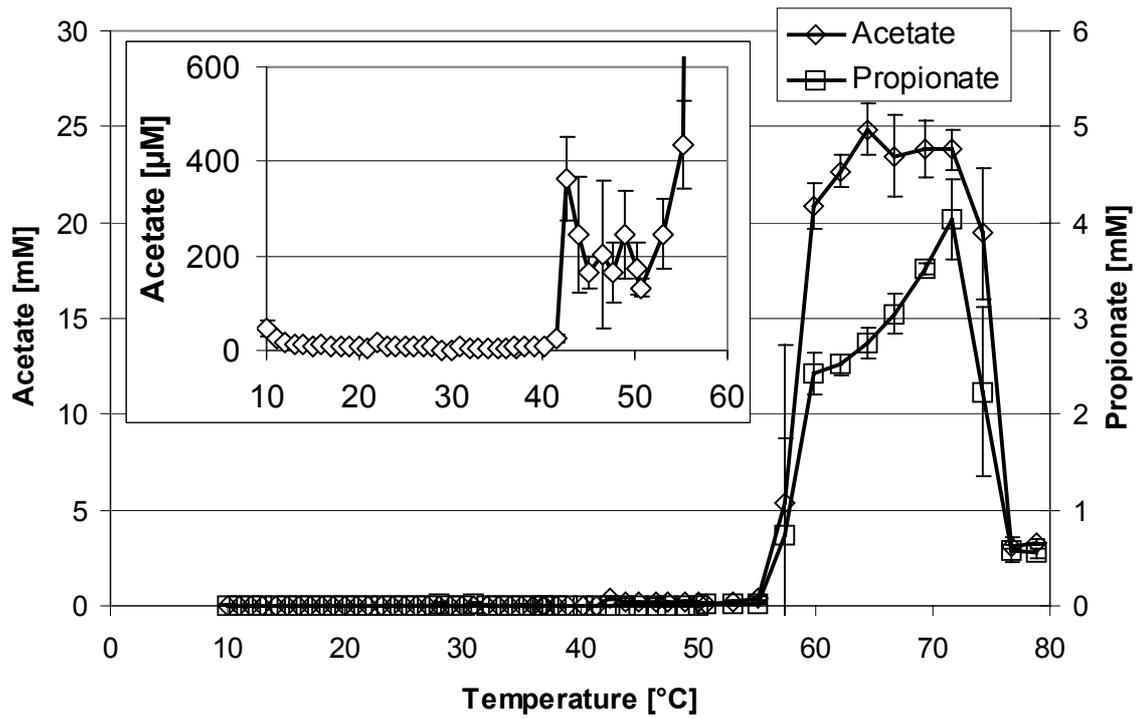


Fig.3: Acetate and propionate concentration in the pore water of anaerobically incubated rice field soil after 89 days of incubation. The insert shows part of the curve at a different scale. Means \pm SD of n=4.

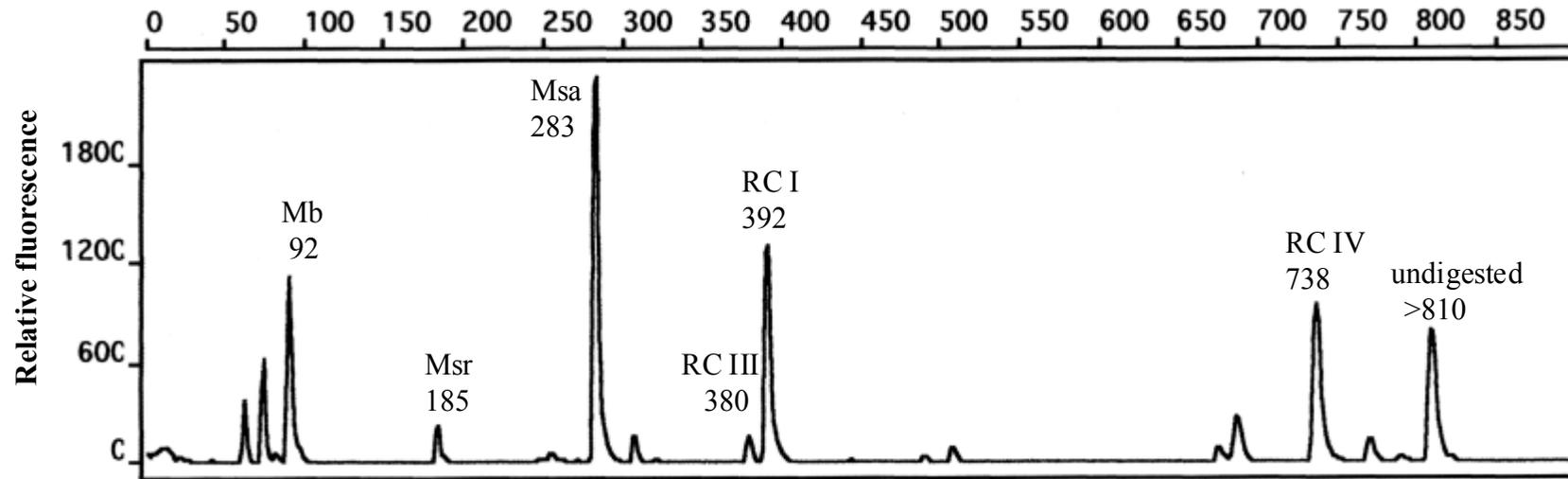


Fig.4: T-RFLP pattern of SSU rDNA extracted from anoxic rice field soil at 37°C. Numbers indicate the length of the fragment in base pairs. Mm: *Methanomicrobiaceae*; Mb: *Methanobacteriaceae*; Msr: *Methanosarcinaceae*; Msa: *Methanosaetaceae*; RC I: Rice cluster I; RC III: Rice cluster III; RC IV: Rice cluster IV.

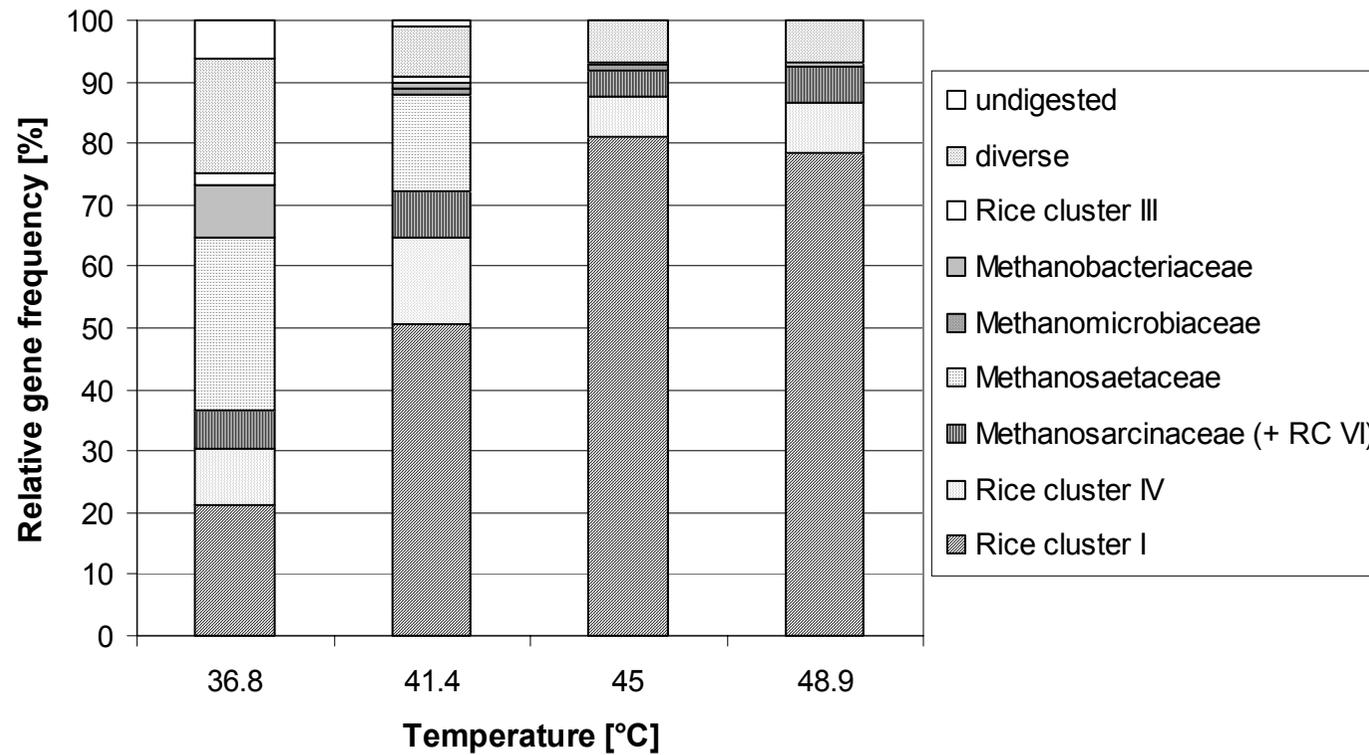


Fig.5: Archaeal population in anaerobically incubated rice field soil after 89 days of incubation. The figure shows the relative abundance of terminal restriction fragments (T-RFs) used as a measure of the composition of the archaeal microbial community. The mean standard deviation of the relative abundance of the T-RFs was $4.7 \pm 0.9\%$. Note that the T-RFs characteristic for *Methanosaetaceae* and *Methanosarcinaceae* may also contain T-RFs of those Rice clusters indicated in brackets.

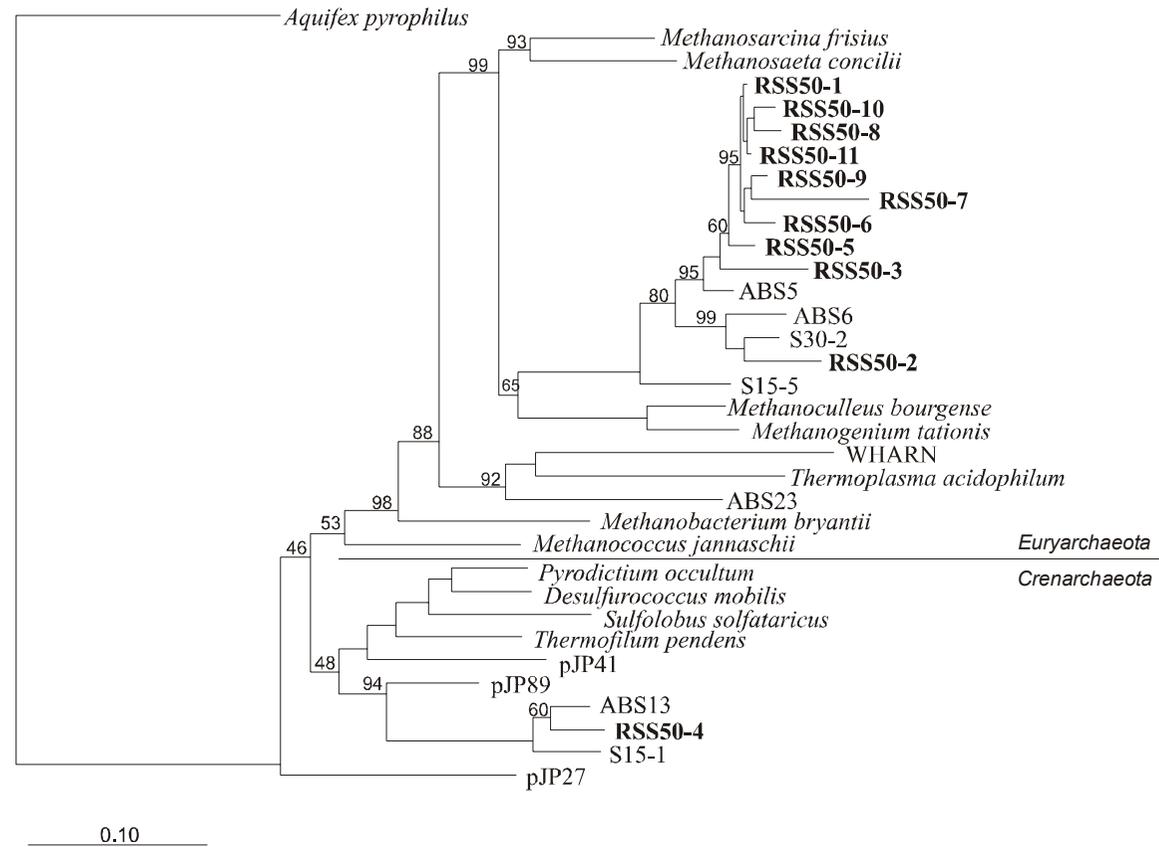


Fig.6: Phylogenetic tree showing SSU rDNA sequences of the clones obtained from the rice soil slurry incubated at 48.9°C in relation to known sequences of *Euryarchaeota* and *Crenarchaeota*, including sequences (ABS5, ABS6, S30-2, S15-5, ABS13, S15-1) of rice cluster I and IV (Großkopf et al., 1998a; Chin et al., 1999) and of environmental sequences (pJP27, pJP41, pJP89) retrieved from a hot spring in the Yellowstone Park (Barns et al., 1994). The scale bar indicates the estimated number of base changes per nucleotide sequence position.

Danksagung

Besonders danke ich meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Ralf Conrad für die Überlassung des Themas, die Betreuung der Arbeit, die vielen Anregungen und die stete Diskussionsbereitschaft.

Herrn Prof. Dr. R. Thauer danke ich für die Begutachtung der Arbeit.

Ich danke Dr. H.-R. Wegener für die Bestimmung der Bodentextur, Dr. Rainer Ruser für die Glucose-Messung, Dr. H. Flessa für die $\delta^{13}\text{C}$ -Bestimmung der organischen Substanz und Dr. Thomas Marik für die Unterstützung bei der Berechnung der Isotopenfraktionierung.

Frau Tanja Hoffmann danke ich für die Durchführung der ^{14}C -Versuche und Frau Melanie Klose sowie Herrn Peter Claus für die stete Hilfsbereitschaft bei der Durchführung der Messungen. Markus Drescher gilt mein Dank für das Beheben so mancher Computerprobleme.

Weiter danke ich Dr. Thomas Lukow für die Einführung in die T-RFLP-Analyse, Dr. Heiner Lüdemann für das „goldene Händchen“ bei der PCR und Dr. Kuk-Jeong Chin für Unterstützung bei den molekularen Versuchen, unendlich viele Pipettenspitzen und ca. 2,5 Liter Lösungen.

Dr. Hans Scholten danke ich für die Hilfe beim Herstellen des Mediums und Dr. Bernhard Nüßlein für die vielen hilfreichen Diskussionen während meiner Doktorarbeit.

Der gesamten Abteilung Conrad gilt mein Dankeschön für das gute und freundliche Arbeitsklima.

Mein ganz besonderer Dank gilt Petra Kratz für die Unterstützung in jeder Lebenslage.

Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst, keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet und sämtliche Stellen, die im Wortlaut oder dem Sinn nach anderen Werken entnommen sind, mit Quellenangaben kenntlich gemacht habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Marburg, den 31.01.2001

Lebenslauf

Axel Fey, geboren am 26.05.1970 in Lich.

Schulbildung

08/1977 – 07/1983	Grundschule und Förderstufe
08/1983 – 07/1990	Herderschule Gießen, Gymnasium
07/1990	Allgemeine Hochschulreife
09/1990 – 10/1991	Zivildienst

Studium

10/1991 – 09/1997	Studium der Agrarwissenschaften an der Justus-Liebig-Universität Gießen
4/1994	Vordiplom
11/1995 – 04/1997	Diplomarbeit am Institut für angewandte Mikrobiologie unter Anleitung von Prof. Dr. J. C. G. Ottow „Quantifizierung der Lachgasemissionen aus einer Wurzelraumanlage“
09/1997	Diplom
Seit Februar 1998	Dissertation am Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie unter Anleitung von Prof. Dr. R. Conrad

Wissenschaftliche Veröffentlichungen

Fey, A., G. Benckiser und J. C. G. Ottow (1999): Emissions of nitrous oxide from a constructed wetland using a groundfilter and macrophytes in waste-water purification of a dairy farm. *Biol. Fertil. Soils* 29: 354-359.

Fey, A. und Conrad, R. (2000): Effect of temperature on carbon and electron flow and on the archaeal community in methanogenic rice field soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 4790–4797.

Fey, A., Chin, K.-J. und Conrad, R. (submitted): Thermophilic methanogens in rice field soil. *Environmental Microbiology*.