

**Der Methankreislauf im Wald- und Reisfeldboden:
Natürliche Prozesse und anthropogene Einflüsse**

Dissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Naturwissenschaften

(Dr. rer. Nat.)

dem

Fachbereich Biologie

Der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Udo Jäckel

aus Schrecksbach

Marburg/Lahn 2001

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

Vom Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg

Als Dissertation am _____ angenommen.

Erstgutachter: Prof. Dr. Ralf Conrad

Zweitgutachter: Prof. Dr. Wolfgang Buckel

Tag der mündlichen Prüfung:

Erklärung

Ich versichere, daß ich meine Dissertation

Der Methankreislauf im Wald- und Reisfeldboden: Natürliche Prozesse und anthropogene Einflüsse

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 Versicherung schließt Zeichnungen und Skizzen mit ein.

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

Teile der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sind in folgenden Artikeln veröffentlicht:

1. **Udo Jäckel und Sylvia Schnell (2000)** Suppression of methane emission from rice paddies by ferric iron fertilization. *Soil Biology and Biochemistry* 32: 1811-1814
2. **Thilo Henckel, Udo Jäckel, Sylvia Schnell und Ralf Conrad (2000)** Molecular analysis of novel methanotrophic communities in forest soil that oxidize atmospheric methane. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 1801-1808
3. **Thilo Henckel, Udo Jäckel und Ralf Conrad (2001)** Vertical distribution of the methanotrophic community after drainage of rice field soil. *FEMS Microbiology Ecology* 34:279-291
4. **Udo Jäckel, Sylvia Schnell und Ralf Conrad (2001)** Effect of moisture, texture and aggregate size of paddy soil on production and consumption of CH₄. *Soil Biology and Biochemistry*, im Druck

Beharre nicht auf Vollkommenheit,
sonst läufst Du Gefahr,
nie mit einer Aufgabe fertig zu werden
oder das Ergebnis Deines Tuns nicht mehr
genießen zu können.

(Lebensweisheit)

Für Lisa-Marie

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	I
Zusammenfassung	II
A. Allgemeine Einleitung	1
A.1. Methan	1
A.2. Das Ökosystem Reisfeld und dessen Bedeutung als Quelle für atmosphärisches Methan	3
A.3. Methanoxidation im Boden	6
A.4. Methanotrophe Bakterien	7
B. Übergreifende Materialien und Methoden	9
B.1. Chemikalien und Gase	9
B.2. Gewächshausbedingungen	9
B.3. Böden	9
B.3.1 Reisfeldböden	9
B.3.2 Waldböden	10
B.4. Analytische Methoden	10
B.4.1 Ionenchromatographische Fe(II) und Fe(III) Bestimmung	10
B.4.2 Nachweis von Sulfat, Nitrat und Nitrit	12
B.4.3 Nachweis organischer Säuren	13
B.4.4 Gaschromatographische Methan- und Ethylen-detektion	14
B.4.5 Gaschromatographische Analyse von Sauerstoff	15
B.4.6 Gravimetrischer Wassergehalt und maximale Wasserhaltekapazität	16
B.4.7 Colorimetrische Bestimmung von Ammonium	17
B.5. Berechnungen	17
B.5.1 Berechnung der Stoffmenge aus Methan-Mischungsverhältnissen	17
B.5.2 Berechnung der Methan/Ethylenoxidiations- und Methanproduktionsraten	18

C. Kapitel 1: Eisenoxiddüngung: Eine Strategie zur Verminderung der Methanemission aus gefluteten Reisfeldern?

C.1 Thematischer Überblick und Zielsetzung	19
C.2 Material und Methoden	21
C.2.1 Herstellung von Ferrihydrit	21
C.2.1.1 Kleine Ansätze	21
C.2.1.2 Große Ansätze (für Felddüngung)	21
C.2.2 Mikrokosmosexperimente	22
C.2.2.1 Experimenteller Aufbau	22
C.2.2.2 Methanflussmessungen	23
C.2.2.3 Eisenbestimmung des Bodens	24
C.2.2.4 Trockengewichtsbestimmung der Pflanzen.	24
C.2.2.5 Eisenbestimmung auf der Wurzeloberfläche	25
C.2.3 Feldexperimente	25
C.2.3.1 Experimenteller Aufbau und Feldbeschreibung	25
C.2.3.2 Methanflussmessungen	28
C.2.3.3 Agrophysiologische Datenerfassung	29
C.2.3.4 Keimungsfähigkeit der geernteten Reiskörner	30
C.2.3.5 Analyse von Kupfer, Eisen, Magnesium und Mangan in Reiskörnern und Reispflanzen	30
C.2.4 Berechnung der Eisenkonzentration	30
C.2.4.1 Wurzel	30
C.2.4.2 Boden	31
C.2.5 Statistische Auswertung	32
C.2.5.1 Spurenelemente: Reispflanzen, Körner und agrophyologische Daten	32
C.2.5.2 Methanemission	32
C.2.6 Kationenadsorbition an Ferrihydrit	32
C.3 Ergebnisse	33
C.3.1 Methanemission	33
C.3.2 Eisenkonzentrationen am Ende des Mikrokosmenexperimentes	36
C.3.3 pH-Wert und Redoxpotential im Mikrokosmosexperiment	38
C.3.4 Kationenadsorbition im Boden und an Ferrihydrit	38
C.3.5 Agrophysiologische Daten und Pflanzenwachstum	40
C.4 Diskussion	45
C.4.1 Methanemission und Eisenreduktion	45
C.4.2 Pflanzenwachstum und Eisentoxizität	48
C.4.3 Schlußbetrachtung	51

D. Kapitel 2: Lokalisierung der Methanoxidierenden und Ethylenoxidierenden Aktivitäten im Waldboden

D.1 Thematischer Überblick und Zielsetzung	53
D.1.1 Methanotrophe Aktivität im Waldboden	53
D.1.2 Ethylen	54
D.2 Material und Methoden	58
D.2.1 Methanoxidation	58
D.2.1.1 Flußmessungen aus Waldboden im Winter	58
D.2.1.2 Methankonzentrationsprofile	58
D.2.1.3 Potentielle Methanoxidation im Bodenprofil	58
D.2.1.4 Ammoniumkonzentration im Profil	59
D.2.1.5 Nitrat- und Nitritkonzentration im Profil	59
D.2.2 Ethylen- und Methanakkumulation	59
D.2.2.1 Profilmessung der potentiellen Methan- und Ethylenproduktion	59
D.2.2.2 Autoklavierter Boden	59
D.2.2.3 Einfluß des Wassergehaltes auf die Ethylenproduktion	60
D.2.2.4 Effekt von Methionin und Ammoniumchlorid auf die Ethylenproduktion und Methanaufnahme von Waldboden	60
D.2.3 Ethylenoxidation	60
D.2.3.1 Messung der potentiellen Ethylenoxidation im Profil	60
D.2.3.2 Kinetik der Ethylenoxidation	61
D.2.4 Hemmung der Methanoxidation	61
D.2.4.1 Einfluß von Ethylen und Methanthiol auf die Methanoxidation	61
D.2.4.2 Reversibilität der Hemmung durch Ethylen und Methanthiol	61
D.3 Ergebnisse	62
D.3.1 Methanaufnahme im Waldboden	62
D.3.2 Lokalisierung der Methanaufnahme im Waldboden	62
D.3.3 Wassergehalt	64
D.3.4 Kohlenstoff und Stickstoffgehalt im Waldboden	66
D.3.5 Ammonium- und Nitratkonzentrationen	67
D.3.6 Ethylenakkumulation unter anoxischen Bedingungen	68
D.3.7 Hemmung der Methanaufnahme durch Methionin	72
D.3.8 Ethylenaufnahmeaktivität	73
D.3.9 Einfluß von Ethylen auf die Methanaufnahme	75
D.3.10 Einfluß von Methanthiol auf die Methanaufnahme	76
D.3.11 Reversibilität der Hemmung	77
D.4 Diskussion	79

E. Kapitel 3: Oxidation von atmosphärischem Methan durch Reisfeldboden aus geflutetem Anbau während der Drainage

E.1 Thematischer Überblick und Zielsetzung	86
E.2 Material und Methoden	87
E.2.1 Labor Experimente mit Reisfeldboden	87
E.2.1.1 Vorinkubation des Bodens	87
E.2.1.2 Methanoxidation und –produktion bei unterschiedlichen Wassergehalten	87
E.2.1.3 Einfluß der Bodentextur auf die atmosphärische Methanoxidation	88
E.2.1.4 Einfluß von Ferrihydrit auf die Methanproduktion und Methanoxidation	88
E.2.1.5 Einfluß der Aggregatgröße auf die Methan- und Sauerstoffaufnahme	89
a Atmosphärische Methanaufnahme nach der Vorinkubation	89
b Aufnahme hoher Methankonzentration während der Vorinkubation	89
E.2.2 Unbepflanzte Mikrokosmen	89
E.2.2.1 Methanemission und –oxidation durch Reisfeldbodenkerne	89
E.2.2.2 Potentielle Methanoxidation und –produktion im Tiefenprofil	90
E.2.3 Bepflanzte Reismikrokosmen	91
E.2.3.1 Methanemission während der Drainage	91
E.2.3.2 Potentielle Methanoxidation einzelner Bodenschichten	92
E.3 Ergebnisse	93
E.3.1 Experimente mit vorinkubiertem Boden	93
E.3.1.1 Einfluß des Wassergehaltes auf die Methanoxidation und –produktion	93
E.3.1.2 Einfluß der Aggregatgröße auf die Methan- und Sauerstoffaufnahme	95
E.3.1.3 Einfluß der Textur auf die Methanoxidation von Reisfeldboden	97
E.3.1.4 Einfluß des Eisengehaltes auf die Methanoxidation	98
E.3.2 Unbepflanzte Bodenkerne	100
E.3.2.1 Methanproduktion und –aufnahme durch Bodenkerne	100
E.3.2.2 Methanaufnahme und –produktion von unterschiedlichen Bodenschichten	101
E.3.3 Bepflanzte Reismikrokosmen	104
E.3.3.1 Methanemission während der Drainage	104
E.3.3.2 Methankonzentrationen unterschiedlicher Bodenschichten	104
E.4 Diskussion	106

F: Allgemeine Schlußbetrachtung	111
G: Literatur	115
H: Anhang	136
Publikationen	
Suppression of methane emission from rice paddies by ferric iron fertilization	136
Molecular analysis of novel methanotrophic communities in forest soil that oxidize atmospheric methane	140
Vertical distribution of the methantrophic community after drainage of rice Field soil	148

Abkürzungen

g-TB	Gramm trockener Boden
g-FB	Gramm feuchter Boden
g-TW	Gramm trockene Wurzel
ppmv	Mischungsverhältnis: part per million by volume
SD	Standardabweichung
SE	Standardfehler
s.o.	siehe oben
s.u.	siehe unten
WHK	Wasserhaltekapazität

Zusammenfassung

Atmosphärisches Methan hat als Treibhausgas einen großen Einfluß auf das Klima unserer Erde. Eine wichtige anthropogene Methanquelle ist der Reisanbau unter gefluteten Bedingungen, wichtige biogene Senken für atmosphärisches Methan sind oxische Böden. Beide werden durch anthropogene Eingriffe stark beeinflusst, so daß ein Konzentrationsanstieg in der Atmosphäre stattfindet und dies zur Veränderung des globalen Klimas führen kann. Die Eisenoxiddüngung, als Strategie zur Verminderung der Methanemission aus dem gefluteten Reisanbau war in diesem Zusammenhang ein Projekt der vorliegenden Arbeit. Ein weiteres Projekt war es, die Fähigkeit von Reisfeldboden zu untersuchen, einen Wechsel von Methanquelle zur Methansenke nach der Drainage zu vollziehen.

Es zeigte sich, daß die Methanemission in bepflanzten Reismikrokosmen mit 15 und 30 g Ferrihydrit (ein amorphes Eisen(III)oxid) pro kg Boden um 43 bzw. 85% vermindert werden konnte. Dies war auf einen verstärkten Elektronenfluß zum Eisen(III) als Elektronenakzeptor beim Abbau von organischem Material zurückzuführen. Im Feldexperiment wurde durch die Ferrihydritdüngung eine 50%ige Methanemissionsverminderung erreicht. Ein negativer Effekt auf das Pflanzenwachstum, wie im Mikrokosmosexperiment, wurde im Feld nicht beobachtet. Die Ergebnisse zeigen, daß Ferrihydritdüngung im Reisfeld als Strategie zur Methanemissionsverminderung erfolgversprechend sein könnte.

Bodenproben aus dem Reisfeld waren nach Vorinkubation unter Luft mit 20% Methan in der Lage, atmosphärisches Methan zu oxidieren. Dasselbe galt für Bodenproben aus den oberen Schichten des Reisfeldbodens. Dagegen konnte diese Fähigkeit in unbepflanzten und bepflanzten Reismikrokosmen während und nach der Drainage nicht beobachtet werden. Der Grund für das Fehlen eines Wechsels von Methanquelle zur Methansenke konnte in weiteren Laborexperimenten herausgefunden werden. Hierbei zeigte sich, daß zum einen die Diffusionslimitierung für Methan und zum anderen die Empfindlichkeit der Methanotrophen gegenüber Austrocknung (< 20% Wasserhaltekapazität) dafür verantwortlich war, daß atmosphärisches Methan nur in begrenztem Umfang oxidiert wurde, während gleichzeitig auch nach der Drainage noch eine deutliche Methanproduktion stattfand.

Ein weiteres Projekt war es zu prüfen, ob die methanotrophe Bakteriengemeinschaft eines Waldbodens aus Marburg in der Lage ist, atmosphärisches Methan zu oxidieren und ob die Methanotrophen einen Einfluß auf den Ethylenkreislauf im Boden haben.

Der untersuchte Waldboden zeigte im Winter eine Aufnahmekapazität von 1 mg Methan pro m² und Tag. Die Bestimmung der potentiellen Oxidation atmosphärischen Methans durch Bodenschichten unterschiedlicher Tiefen und die Bestimmung von Profilen der Methankonzentration zeigte, daß die maximale Methanaufnahme in tieferen Bodenschichten lokalisiert war. Die maximale Aktivität der Ethylenoxidation war hingegen oberhalb der Methanoxidation lokalisiert und zeigte, daß vermutlich andere Organismen für dessen Oxidation verantwortlich sind. Kintikmessungen der Ethylenoxidation unterstützten diesen Befund, da sie das Vorhandensein von zwei verschieden großen apparenten K_m-Werten für Ethylen zeigten. Eine Akkumulation von Ethylen konnte nur unter einer Stickstoffatmosphäre beobachtet werden. Bei dem Versuch die Ethylenproduktion durch Methionin zu stimulieren, wurde festgestellt, daß umweltrelevante Methioninkonzentrationen zu einer deutlichen Hemmung der Methanoxidation führen. Dies läßt vermuten, daß Methionin neben anderen bekannten natürlichen Substanzen für die Lokalisierung der methanotrophen Aktivität in tieferen Bodenschichten verantwortlich war. Über die Art der Hemmung kann bisher nur spekuliert werden. Methanthiol, ein mögliches Abbauprodukt des Methionins, hemmte ebenfalls die Oxidation von atmosphärischem Methan.

A. Allgemeine Einleitung

A.1 Methan

Methan, wie auch CO_2 , N_2O und H_2O , hat die Eigenschaft, die erdreflektierte Sonnenstrahlung (Infrarot-Strahlung) zu absorbieren. Die absorbierte Wärmeenergie wird so in der Erdatmosphäre zurückgehalten und führt dort zu deren Erwärmung (Treibhauseffekt). In einer Erdatmosphäre ohne Treibhausgase wäre die durchschnittliche Temperatur der Erdoberfläche -18°C . Die Entwicklung von Leben auf der Erde wäre hierdurch vermutlich nicht möglich gewesen.

Der globale Methankreislauf (Abb. A.1) wird durch biotische und abiotische Prozesse kontrolliert. Rund 80% des Methans entstehen durch biologische Prozesse (Heyer, 1990). Es wird als Endprodukt des anaeroben Abbaus von organischem Material hauptsächlich aus CO_2/H_2 und Acetat durch methanogene *Archaea* gebildet. Die wichtigsten biogenen Quellen für atmosphärisches Methan sind natürliche Feuchtgebiete mit 115 Tg pro Jahr, Wiederkäuer mit 80 Tg pro Jahr, Reisfelder mit 60 Tg pro Jahr und Termiten mit 20 Tg pro Jahr. Nicht biogene Quellen sind Kohlegruben und die Petroleumindustrie, zusammen 100 Tg pro Jahr und die Biomasseverbrennung mit 40 Tg pro Jahr (IPCC, 1994).

Im Vergleich zu den zahlreichen Quellen existieren nur wenige Senken für atmosphärisches Methan: Durch photochemische Reaktionen mit Hydroxylradikalen werden rund 88% abgebaut, ca. 7% gelangen durch Diffusion in die Stratosphäre. Die einzige biogene Senke für atmosphärisches Methan stellt die Oxidation von Methan zu CO_2 durch methanotrophe Bodenbakterien dar. Dieser Prozeß ist mit etwa 5% an der Methansenke beteiligt (Wuebbles et al., 1999).

Der Methanfluß aus methanogenen Systemen wird ebenfalls durch methanotrophe Bakterien beeinflusst. Während der Passage durch die oxischen Zonen an der Bodenoberfläche und den wurzelumgebenden Boden, werden bis zu 97% des produzierten Methans oxidiert, bevor es in die Atmosphäre gelangt (Conrad und Rothfuss, 1991; Banker et al. 1995; Gilbert und Frenzel, 1995; Denier van der Gon und Neue, 1996; Lombardi et al., 1997; Bosse und Frenzel, 1998; Krüger et al., 2000).

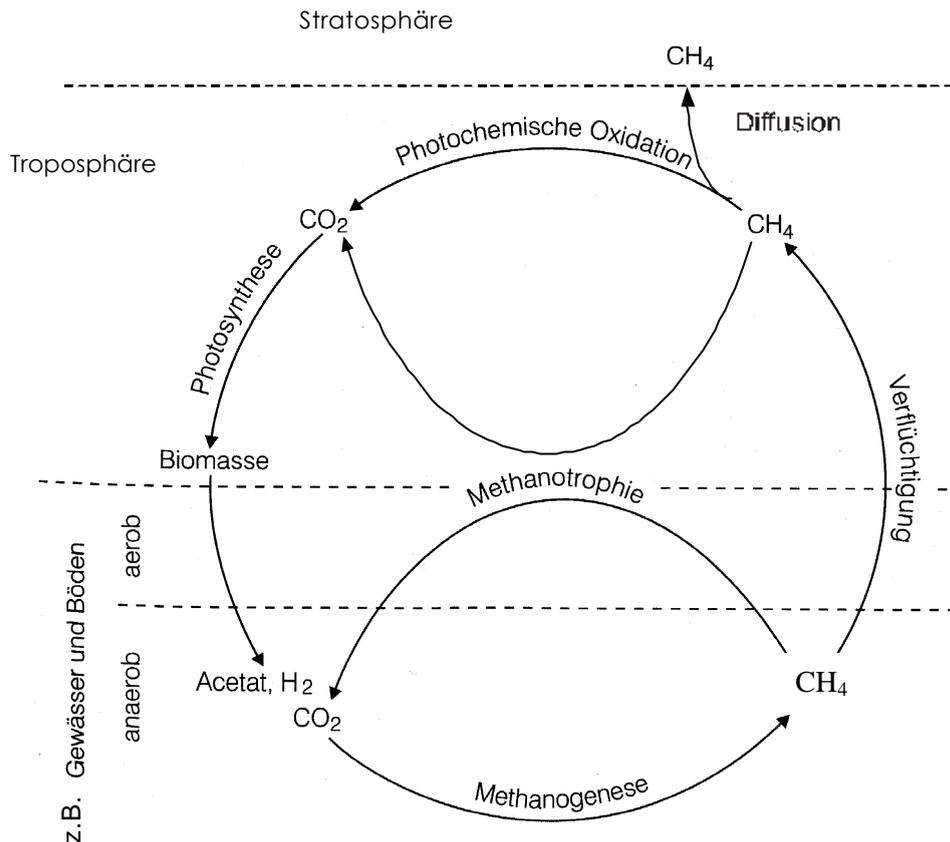


Abb. A.1: Der globale Methankreislauf (verändert nach: Fritsche, 1998)

Die atmosphärische Methankonzentration hat sich innerhalb der letzten Jahrhunderte, nach der Industrialisierung und mit exponentiell steigender Weltbevölkerung, mehr als verdoppelt. (Rasmussen und Khalil, 1984; Pearman et al., 1986; Craig et al., 1988; Blake und Rowland, 1988; Crutzen, 1991). 1997/98 hat sie etwa 1,73 ppmv erreicht (Dlugokencky et al., 1998), steigt weiterhin an und verursacht neben den anderen anthropogenen Treibhausgasen eine zusätzliche Erwärmung der Erdatmosphäre.

Methan absorbiert etwa 24 mal effektiver die Wärmeenergie als Kohlendioxid (WMO, 1999). Durch photochemische Reaktionen des Methans entstehen außerdem H_2O , CO_2 und Ozon in der Atmosphäre, die ebenfalls Treibhausgase sind. Betrachtet man nun die Fähigkeit eines Methanmoleküls zur Erwärmung der Erdatmosphäre über einen Zeitraum von 20 Jahren, ist diese Fähigkeit etwa 62 ± 20 größer als die eines Moleküls Kohlendioxid (IPCC, 1996). Methan ist somit, obwohl die Konzentration verglichen mit Kohlendioxid (350 ppmv) niedrig ist, das zweit wichtigste

Treibhausgas, nach Kohlendioxid. Der Anteil des Methans am anthropogen verursachten Treibhauseffekt liegt bei etwa 15% (Rodhe, 1990).

Als eine Ursache für den Anstieg von Methan wird die wachsende Bevölkerung gesehen. So vergrößern sich einerseits die Quellen durch z.B. die Zunahme der Rinderbestände, die verstärkte Biogasproduktion, die Zunahme der Mülldeponien und dem ausgedehnten und intensivierten Reisanbau. Andererseits werden biogene Senken durch den Menschen verringert wie z.B. durch Düngung und mechanische Beanspruchung des Bodens, sowie durch den Einsatz von Pflanzenschutzmitteln. Beide anthropogenen Einflüsse bewirken somit einen weiteren Anstieg der Methankonzentration in der Atmosphäre.

A.2 Das Ökosystem Reisfeld und dessen Bedeutung als Quelle für atmosphärisches Methan

Die zur Reisproduktion genutzte Landfläche stellt mit ca. 1,5 Mio. km² 10% der global genutzten Ackerfläche bzw. 3,6% der globalen landwirtschaftlich nutzbaren Fläche dar. Außerdem hat sie mit 21% der Fläche globaler Feuchtgebiete eine große Bedeutung als limnisches Habitat (Lefroy et al., 1992).

Die Verdopplung der Weltbevölkerung innerhalb der letzten 30 Jahre hat eine deutliche Steigerung der globalen Reisproduktion mit sich gebracht. Dies war jedoch nicht auf eine wesentlich vergrößerte Anbaufläche zurückzuführen (Tab. A1), sondern auf den Einsatz geeigneter Düngemittel, der Züchtung neuer Hochertragssorten, sowie der Veränderung der Kultivierungsbedingungen.

Tabelle A1: Anbaufläche und Reisproduktion in den Jahren 1961 und 1999

	Weltweit 1961		Weltweit 1999		Faktor
Reisanbaufläche	115501200	ha*	155128100	ha*	1,3
Reisproduktion	215654700	t*	596485300	t*	2,8
Ertrag	1,86 t/ha		3,84 t/ha		2,1

* **Quelle:** Statistische Datenbank der FAO (<http://apps.fao.org/lim500/nph-wrap.pl?Production.Crops.Primary&Domain=SUA>)

Je nach Wasserverfügbarkeit unterscheidet man vier verschiedene Methoden im Reisanbau (Tab. A2).

Tabelle A2: Global bewirtschaftete Flächen der unterschiedlichen Reisanbaumethoden

	Fläche in Mio. [ha]
• kontrolliert gefluteter Reisanbau	79
• regenbewässerter Reisanbau	36
• Hochland Reisanbau	19
• unkontrollierter Überflutung ausgesetzter Reisanbau (z.B. Tief- und Tiefstwasserreis)	13

Quelle : <http://machno.hbi-stuttgart.de/~payer/weltw411.html>

Die Wasserverfügbarkeit hat hierbei nicht nur Einfluß auf das Wachstum und den Ertrag der Reispflanze, im bewässerten Reisanbau werden wesentlich höhere Erträge erzielt, sondern auch auf die Sauerstoffverfügbarkeit im Boden. Im Reisanbau mit kontrollierter Flutung ist der Boden durch die stark verminderte Diffusion von gelösten Gasen im Wasser über die Vegetationsperiode größtenteils anoxisch. Nur die oberste Bodenschicht sowie eine dünne Zone um die Reisswurzel bleibt oxisch (Watanabe und Fursaka, 1980; Frenzel et al., 1992; Gilbert und Frenzel, 1995; Kirk und Bajita, 1995). Im regenbewässerten Tiefland und beim Anbau mit unkontrollierter Überflutung findet durch die schwankende Wasserverfügbarkeit ein Wechsel von oxischen und anoxischen Verhältnissen statt. Der Boden im nicht gefluteten Hochlandreisanbau ist hingegen überwiegend oxisch.

Mehr als die Hälfte des Reisanbaus findet unter kontrollierter Flutung statt (Tab. A2), welche den höchsten Ertrag aber auch die höchste Bildung von Methan ermöglicht. In vielen Studien wurden Abschätzungen zur globalen Methanemission aus Reisfeldern durchgeführt, wobei die geschätzten Methanmengen sehr stark variierten (Tab. A3). Diese Schwankungen zeigen, daß solche

Abschätzung von vielen Faktoren wie z.B. von Bodentyp, Temperatur, Kultivierungstechnik sowie Art und Weise der Düngung abhängig sind (Wassmann et al., 1993).

Nach Abschätzungen von Stern und Kaufmann (1996) ist die globale Methanemission durch den Reisanbau in den Jahren 1860 - 1993 von ca. 40 auf 100 Tg Methan pro Jahr angestiegen. Der Wechsel von unkontrollierter zu kontrollierter Flutung, der zu einer erhöhten Methanemission pro Fläche in den 60iger bis in die 90iger Jahren führte wurde als wichtiger Punkt genannt (Denier van der Gon, 2000).

Tabelle A3: Globale Methanemission aus Reisfeldern (Tabelle aus: Wassmann et al., 1993)

Zitat		Geschätzt (Tg CH ₄ Jahr ⁻¹)
Koyama	1964	190
Ehalt und Schmidt	1978	280
Chicerone und Shetter	1981	59
Khalil und Rasmussen	1983	95
Seiler et al.	1984	35 - 59
Blake	1984	142 - 190
Crutzen	1985	120 - 200
Holzappel-Pschorn und Seiler	1986	70 - 170
Cicerone und Ormeland	1988	60 - 170
Schutz et al.	1989	50 - 150
Asselmann und Crutzen	1989	30 - 75 ^a
		60 - 140 ^b
Schütz und Seiler	1989	70 - 170
Schütz et al.	1990	50 - 150
Wang et al.	1990	60 - 120
Neue et al.	1990	25 - 60
Bouwmann	1990	53 - 114

^aBerechnet aus mittleren Emissionsraten

^b Berechnet aus der Temperaturabhängigkeit der Emissionsraten

Aufgrund der weiterhin wachsenden Weltbevölkerung und den damit verbundenen Maßnahmen die Reisproduktion bis zum Jahre 2020 um ca. 65% (Neue, 1997) zu steigern, wird eine ebenfalls erhöhte Methanemission durch Reisfelder innerhalb der nächsten Jahre erwartet.

A.3 Methanoxidation im Boden

Böden sind durch die methanotrophe Aktivität die derzeit einzig bekannten biogenen Nettosenken für atmosphärisches Methan. Sie besitzen eine geschätzte globale Aufnahmekapazität von ca. 30-40 Tg Methan pro Jahr (Dörr et al., 1993).

Seiler et al. (1984) zeigten, daß tropische Böden als eine Senke für atmosphärisches Methan fungieren können. Später wurde die Oxidation atmosphärischen Methans auch in Torfböden (Megraw und Knowles, 1987; Yavitt et al., 1990a), Tundra Böden (Whalen und Reeburgh, 1990), Waldböden der temperierten Zonen (Stuedler et al., 1989; Born et al., 1990), Wiesenböden (Mosier et al., 1991; Minami et al., 1993), Wüstenböden (Striegl et al., 1992) und gedüngten Böden (Hütsch et al., 1993) demonstriert. Durch diese Ergebnisse wurde postuliert, daß methanotrophe Bakterien auch sehr niedrige Methankonzentrationen $< 1,7$ ppmv oxidieren können. Kinetikmessungen der Methanaufnahme durch Böden von Bender und Conrad (1992) zeigten zwei unterschiedliche Methanaufnahmekinetiken, die sie auf zwei Organismengruppen zurückführten. Sie bezeichneten diese als hoch (niedriger $K_{m(app)}$) bzw. niedrig affine (hoher $K_{m(app)}$) Methanotrophe.

Oberflächenböden und oxische Rhizosphärenböden aus Feuchtgebieten, die relativ hohen Methankonzentrationen ausgesetzt sind, zeigen $K_{m(app)}$ Werte von 6600-10700 nM (Bender und Conrad 1993; Dunfield und Knowles, 1995; Czepiel et al., 1995), was einer niedrigen Affinität entspricht. Oxische Böden besitzen hohe Affinitäten mit $K_{m(app)}$ Werten von 20-200 nM (Bosse und Frenzel, 1997; King, 1992, 1994), während methanotrophe Reinkulturen lediglich niedrige Affinitäten mit $K_{m(app)}$ Werten von 800-66000 nM zeigen (Bedard und Knowles, 1989; Carlsen et al., 1991; King, 1992). Bis zu diesem Zeitpunkt fehlte ein methanotrophes Isolat, welches für die Oxidation von atmosphärischem Methan im Boden befähigt war. Erst Dunfield et al., (1999) konnten ein methanotrophes Bakterium (Stamm LR1) anreichern und isolieren (Dunfield und Conrad, 2000), welches eine Veränderung des $K_{m(app)}$ bei verschiedenen (Dunfield und Conrad, 2000) Methankonzentrationen zeigt und sowohl auf hohen und niedrigen Methankonzentrationen wachsen kann.

A.4 Methanotrophe Bakterien

Die erwähnten methanotrophen Bakterien sind eine Gruppe gram negativer und obligat aerober Bakterien, welche die Fähigkeit besitzen Methan als alleinige Energie und Kohlenstoffquelle zu nutzen. Sie wurden in verschiedensten Habitaten und geographischen Gebieten auf der Erde gefunden (Wittenbury et al., 1970a; Heyer, 1977; Heyer et al., 1984).

Das erste methanotrophe Bakterium wurde bereits durch Söhngen (1906) isoliert. Erst Jahre später isolierten und charakterisierten Whittenbury et al. (1970b) über 100 methanotrophe Bakterien und unterteilten sie aufgrund ihrer Morphologie, Überdauerungsstadien, intrazellulärer Membranen und anderen physiologischen Eigenschaften in fünf Genera: *Methylomonas*, *Methylobacter*, *Methylococcus*, *Methylocystis* und *Methylosinus*. Heute werden die weiteren Genera hinzugezählt: *Methylomicrobium*, *Methylocaldum* und *Methylosphaera* (Tab. A4). Neueste Daten von Bodrossy et al. (1999) zeigen die Abspaltung eines weiteren Genus von thermophilen Methanotrophen: *Methylothermus*. Dedysh et al. (1998a) isolierte ein acidophiles methanoxidierendes Bakterium, welches zum Genus *Methylocella* zählt (*α -Proteobacteria*) und nahe verwandt zum Genus *Beijerickia* ist.

Aufgrund ihres Membranaufbaus und der phylogenetischen Stellung werden die Methanotrophen heute in Typ I und Typ II gruppiert. Phylogenetisch werden Typ I Methanotrophe den γ -Proteobakterien zugeordnet. Sie besitzen einem Membranaufbau aus hauptsächlich 16:1 Phospholipiden, während Typ II Methanotrophe zu den α -Proteobakterien gehören, deren Membran größtenteils aus 18:1 Phospholipiden aufgebaut ist (Tab. A4).

Das Schlüsselenzym der methanotrophen Bakterien ist die Methanmonooxygenase, welche in löslicher und membrangebundener Form vorliegt. Die Methanmonooxygenase katalysiert die sauerstoffabhängige Umsetzung von Methan zu Methanol unter Verbrauch von Reduktionsäquivalenten. Methanol wird durch die Methanoldehydrogenase zu Formaldehyd oxidiert, welches das zentrale Intermediat für die Assimilation darstellt und je nach Organismus über den Ribulosemonophosphat- oder den Serin Weg (Tab A4) zum Aufbau von Zellmaterial genutzt wird. Die Oxidation zu CO₂ durch die Formaldehyd- und Formiatdehydrogenase liefert insgesamt 6 Elektronen von denen zwei wieder zur Aktivierung des Methans verbraucht werden, während die anderen Elektronen zur ATP-Generierung in der Atmungskette genutzt werden können.

Tabelle A4: Übersicht Methanotrophe (verändert nach: Murell et al., 1998)

Genus	Phylogenetische Stellung	Membran Typ	Haupt Phospholipid	Kohlenstoff - Assimilationsweg	Typ der Methanmonooxygenase
<i>Methylomonas</i>	<i>g Proteobacteria</i>	Typ I	16:1	RuMP	pMMO
<i>Methylobacter</i>	<i>g Proteobacteria</i>	Typ I	16:1	RuMP	pMMO
<i>Methylomicrobiu m</i>	<i>g Proteobacteria</i>	Typ I	16:1	RuMP	pMMO
<i>Methylosphaera</i>	<i>g Proteobacteria</i>	Typ I	16:1	RuMP	pMMO
<i>Methylocaldum</i>	<i>g Proteobacteria</i>	Typ I	16:1	RuMP/Serin	pMMO
<i>Methylococcus</i>	<i>g Proteobacteria</i>	Typ I	16:1	RuMP/Serin	pMMO/sMMO
<i>Methylosinus</i>	<i>a Proteobacteria</i>	Type II	18:1	Serin	pMMO/sMMO
<i>Methylocystis</i>	<i>a Proteobacteria</i>	Type II	18:1	Serin	pMMO/sMMO
<i>Methylocella</i>	<i>a Proteobacteria</i>	Type II	18:1	Serin	sMMO

RuMP: Ribulosemonophosphat Weg; Serin: Serin Weg; pMMO: partikuläre Methanmonooxygenase; sMMO: lösliche Methanmonooxygenase

Durch die Unspezifität der Methanmonooxygenase wird unter anderen auch die Oxidation von Ammonium, Kohlenmonoxid, Ethylen, Propylen, Cyclohexan, Chloromethan und Trichlorethylen katalysiert (Little et al., 1988; Brusseau et al., 1990; Vlieg et al., 1996). Eine weitere Oxidation dieser Substrate ist jedoch durch die Substratspezifität der Methanol-, Formaldehyd- und Formiatdehydrogenase verhindert und ein Energiegewinn bleibt somit aus.

B. Übergreifende Materialien und Methoden

B.1 Chemikalien und Gase

Die verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Fluka (Buchs, Schweiz) und Merck (Darmstadt) bezogen und besaßen, sofern nicht gesondert vermerkt den Reinheitsgrad „zur Analyse“. Die Gase stammten von der Firma Messer Griesheim (Düsseldorf).

B.2 Gewächshausbedingungen

Alle bepflanzten und unbepflanzten Mikrokosmenexperimente wurden, wenn nicht ausdrücklich anders erwähnt, im Gewächshaus mit alternierendem Tag und Nacht Rhythmus durchgeführt. Eine gleichmäßige Lichtintensität sollte durch zusätzliche Lampen (Philips, Son-T-Agro 400, Belgien) gewährleistet werden. Die Lichtintensität unter den Lampen betrug $366 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Mikrovolt Integrator, Type MV2 und Quantum Sensor, Type QS, Firma Delta-T Devices LTD, England). Die Solltemperatur im Gewächshaus war 25°C . Die Temperatureaufnahme im Gewächshaus zeigte jedoch einen jahreszeitlich bedingten Verlauf mit einer maximalen Temperatur im Sommer von 32°C und einer minimalen im Winter von 21°C im Jahr 1998.

B.3 Böden

B.3.1 Reisfeldböden

Die drei verwendeten Reisfeldböden wurden innerhalb der letzten fünf Jahre (Daten: siehe Tab. 1) im Umkreis von ca. 50 km um Vercelli (Poebene, Oberitalien) entnommen. Der Boden wurde nach der Probenahme bei Raumtemperatur getrocknet und gelagert. Vor den Experimenten wurde der Boden mittels Backenbrecher zerkleinert und anschließend mit einem Sieb auf eine Korngröße von $\leq 2 \text{ mm}$ gesiebt.

Tabelle B1: Zeitpunkt der Bodenentnahme, Textur, C-H-N-Gehalt und Ammoniumstickstoff der verschiedenen Reisfeldböden

Probenahme		Sandgehalt	Schluff	Ton	C	N	H	NH ₄ -N
		(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	[µg g-TB ⁻¹]
Arborio	November 1995	10,7	65,5	23	1,54	0,11	0,73	5,5
Vercelli								
-lehmiger	April 1997	10,5	75,9	13,6	1,79	0,13	0,63	14,6
-sandiger	Oktober 1998	50,6	35,4	14	n.d.	n.d	n.d	10,4

n.d. nicht detektiert

B.3.2 Waldboden

Verschieden tiefe Bodenkerne (16-25 cm) wurden mit Hilfe von Plastikröhren in einem Laubwald auf den Lahnbergen (Marburg) gestochen. Die genauen Bodenparameter und die Lokalisation sind im Anhang (Henckel et al., 2000) beschrieben.

Zur Probennahme wurde die Laubaufgabe mit einem Messer vorsichtig durchgeschnitten, um dann das Plexiglasrohr mit einem Gummihammer in den Boden zu treiben. Bei gewünschter Tiefe wurde die Röhre mit einem Gummistopfen verschlossen und unter vorsichtigem Drehen aus dem Boden gezogen. Die Weiterverarbeitung bzw. Messung des Gasflusses in und aus den Kernen erfolgte direkt oder spätestens zwei Tage nach Lagerung bei Raumtemperatur.

B.4 Analytische Methoden

B.4.1 Ionenchromatographische Fe(II) und Fe(III) Bestimmung (Schnell et al., 1998)

Die Metallionen wurden als Weinsäurekomplex auf einer Kationensäule getrennt und anschließend in einer Derivatisierungsreaktion mittels PAR (4-(2-Pyridyl)-(2)-azo-resorcin) nachgewiesen. Der

Metall-Farbkomplex wurde online photometrisch detektiert. Der Ionenchromatograph (Sykam, Gilching) zur Metallbestimmung setzte sich aus folgenden Geräten zusammen:

Pumpen	S1100 und S1121
Degaser	S7510
temperierbarer Säulenofen	S4110
Kationentrennsäule	LCA K02, Sykam
Säulenmaterial:	PEEK (Polyetheretherketon)
Länge:	15 cm
Innendurchmesser:	4,0 mm
Trennmaterial:	Kationenaustauscher aus Silika (IBJ K3) 5µm mit Polymer beschichtet
Teflonreaktor	
Material	Teflonschlauch, Luftmaschen gehäkelt
Länge:	5 m
Innendurchmesser:	0,5 mm
UV/VIS- Detektor	UVIS 205, Firma Linear, U.S.A.
Probenaufgeber	S5200

Meßbedingungen:

Fließmittel	0,1 M Weinsäure pH 2,8 bis 3,2 die pH-Wert-Einstellung erfolgte mit einer gesättigten LiOH-Lösung
Nachweisreagenz	0,215 g 4-(2-Pyridyl)-(2)-azo-resorcin) (PAR)/l in 4% Ammoniak
Mischungsverhältnis	(Fließmittel/Nachweisreagenz)
Zur Fe(II) und Fe(III) Bestimmung	80%/20%
Fluß	1,2 ml/min
Wellenlänge	520 nm
Temperatur	45°C
Nachweisgrenze	Fe(II), Fe(III): 5 µM mit 10 µl Probenvolumen

Der Eluent wurde nach der pH-Wert Einstellung sterilfiltriert (0,2 µm Porengröße, Sartorius, Göttingen), entgast und unter N₂ gehalten. Sowohl Eluent als auch Nachweisreagenz wurden mittels Degaser entgast, um eine Oxidation der Proben während der Elution zu vermeiden. Um eine Kontamination der Proben mit Eisen auszuschließen, waren alle an der Elution beteiligten Komponenten des Ionenchromatographen aus PEEK oder Teflon. Zur Kalibrierung wurden Standards von Ammoniumeisen(II)-sulfat und Ammoniumeisen(III)-sulfat in 0,5 M HCl mit den Konzentrationen 50, 100, 200, 400 und 500µM verwendet. Die Auswertung und Aufzeichnung der Daten erfolgte durch das Programm Pyramid (Axiom Chromatography Inc., California, U.S.A.).

B.4.2 Nachweis von Sulfat, Nitrat und Nitrit (Bak et al., 1991)

Zur Bestimmung diente ein Ionenchromatograph der Firma Sykam (Gilching), der aus einer Pumpe (S1000), einem temperierbaren Säulenofen (S4110) mit Anionentrennsäule (LCA09, Sykam), einem Leitfähigkeitsdetektor (S3110) zur Bestimmung von Sulfat, einem Suppressorsystem (S2210, S6330)

und einem nachgeschaltetem UV/VIS-Detektor (UVIS 204, Firma Linear, U.S.A.) zur Bestimmung von Nitrat und Nitrit bestand. Die Proben wurden durch einen automatischen Probenaufgeber Jasco 851-AS (Firma Jasco, Japan) aufgegeben. Das Probenvolumen betrug 50 μl .

Meßbedingungen:

Säule	Material: Edelstahl
Länge:	6 cm
Innendurchmesser:	4,6 mm
Trennmaterial:	Styro/Divinolbenzol
Korngröße:	10 μm
Temperatur:	65°C
Fließmittel	3 mM Natriumhydrogencarbonat 6 mM Natriumcarbonat
Fluß	2 ml min ⁻¹
UV/VIS-Detektor	Wellenlänge 218 nm

Als Eichstandard diente eine 100 μM Lösung mit Nitrat, Nitrit und Sulfat. Die Auswertung erfolgte mit dem Integrationsprogramm Pyramid (Axxiom Chromatography Inc., U.S.A.). Zur Identifizierung der Proben wurden die Retentionszeiten der Peaks mit denen des Standards verglichen.

B.4.3 Nachweis organischer Säuren (Krumböck und Conrad, 1989)

Die Bestimmung von organischen Säuren und Alkoholen erfolgte mit einem HPLC System der Firma Sykam (Gilching). Das Trennungsprinzip war das der Ionenausschlußchromatographie.

Das System setzte sich durch folgende Geräte zusammen:

Pumpe	(S1000)
-------	---------

temperierbarer Säulenofen	(S4110)
mit Trennsäule der Firma Biorad (Richmond, Kalifornien)	
Material:	Edelstahl
Trennmaterial:	Aminex HPX 87 H
Innendurchmesser:	7,8 mm
Länge:	30 cm
automatischer Probenaufgeber	Jasco 851-AS (Firma Jasco, Japan)
Detektor (Brechungs-Index)	RI-Detektor (Typ Erc-7512, Firma Erma, Tokio)

Zur Aufzeichnung und Auswertung diente ein Integrationsprogramm der Firma Axion Chromatography Inc. (California, U.S.A.). Die Eichung erfolgte mit einem Standard, der je 100 µM von folgenden Verbindungen enthielt: Lactat, Formiat, Acetat, Butyrat, Valerat, Propionat, Isopropanol und n-Butanol. Die Retentionszeiten der Standards erlaubte die Zuordnung der Peaks in den Proben.

Meßbedingungen:

Fließmittel	1 mM Schwefelsäure
Fluß	0,8 ml/min
Ofentemperatur	65 °C
Detektor	
Temperatur:	40 °C
Meßzellenvolumen:	7 µl

B.4.4 Gaschromatographische Methan- und Ethyldetektion

Zur Bestimmung der Methan- und Ethylenkonzentration wurde ein Gaschromatograph (Shimadzu GC-8A, Japan) mit Flammenionisationsdetektor verwendet. Die Detektionssignale wurden mit dem Integrationsprogramm Peak simple (SRI Instruments, California, U.S.A.) ausgewertet.

Meßbedingungen:

Säule	Trennmaterial: Poropak QS, 80/100 mesh Länge: 3,5 m, Innendurchmesser: 5,33 mm Temperatur: 50°C
Injektionstemperatur	110°C
Trägergas	Stickstoff
Brenngase	Wasserstoff und Synthetische Luft

Die Eichung erfolgte nach Feststellung der Linearität des Meßgerätes für das Gas durch Einpunkt-Eichung mit 1 ml des Eichgases der Konzentration im gewünschten Bereich. Die Meßpräzision lag bei einer Standardabweichung von bis zu $\pm 2,5$ %.

B.4.5 Gaschromatographische Analyse von Sauerstoff (Koschorreck und Conrad, 1993)

Die Sauerstoffdetektion erfolgte durch gaschromatographische Messung mit integriertem Wärmeleitfähigkeitsdetektor (WLD, GC 8A, Shimadzu, Japan). Als Standard diente synthetische Luft mit einem O₂ Mischungsverhältnis von 20,5%. Die Auswertung erfolgte über einen Cromatopac C-R6A-Integrator (Shimadzu, Kyoto, Japan) über Flächenintegration. Das Einspritzvolumen betrug 0,2 ml.

Meßbedingungen:

Säule:	Edelstahl, Molekularsieb 5A, Mesh 80/100
--------	---

Länge:	2 m
Innendurchmesser:	4 mm
Fluß: Trägergas N ₂	37,5 ml min ⁻¹

Temperaturen:

Injektor:	80°C
Säule:	80°C
Detektor:	80°C

B.4.6 Gravimetrischer Wassergehalt (GW) und maximale Wasserhaltekapazität (mWHK)

(Schlichting und Blume, 1966)

Plastikzylinder wurden unten mit Gaze (Nylontuch) und Filterpapier verschlossen und etwa zu $\frac{3}{4}$ mit Boden gefüllt. Zur Wassersättigung wurden sie 2 h bis zur Bodenfüllhöhe in Wasser gestellt, so daß kein Wasser von oben in den Zylinder lief. Anschließend wurde die obere Öffnung des Zylinders mit Parafilm verschlossen und der Zylinder mit der unteren Öffnung auf feuchten Sand gestellt. Der Boden wurde dann über einen Zeitraum von 3 h equilibriert. Der gravimetrische Wassergehalt (GW) zu diesem Zeitpunkt entsprach der maximalen Wasserhaltekapazität (mWHK) des Bodens (GW = 100% WHK).

Der Wassergehalt wurde von 4 x 5 g Boden aus den Zylindern durch Trocknung bis zur Gewichtskonstanz bei 105°C und abkühlen im Exsikkator bestimmt und nach folgender Formel in die Wasserhaltekapazität umgerechnet.

$$GW [\%] = \frac{(Fg - Tg)}{Tg} 100$$

GW: Gravimetrische Wassergehalt

F_g : Feuchtgewicht des Bodens [g]

T_g : Trockengewicht des Bodens (getrocknet bei 105°C bis zur Gewichtskonstanz [g])

Die in den Experimenten ermittelten gravimetrischen Wassergehalte wurde als Prozent der maximalen Wasserhaltekapazität [% WHK] angegeben.

B.4.7 Colorimetrische Bestimmung von Ammonium (Kandeler und Gerber, 1988)

Luftgetrockneter oder frischer Boden wurde 1:10 (w/v) mit 1 M KCl-Lösung versetzt auf einem Horizontalschüttler für 1 h geschüttelt (4°C, 200 rpm) (Typ 886032/3, Braun, Melsungen). Die Aufschlämmung wurde durch Filterpapier (Schleicher & Schuell, Dassel) filtriert und die Extrakte bei -20°C eingefroren, sofern sie nicht direkt analysiert wurden.

Die Bestimmungen der Filtrate erfolgten colorimetrisch. Die Absorption wurde in einem Photometer (Unikon 30F, Spektrometer 930, Kontron-Instruments GmbH, Stuttgart) bei einer Wellenlänge von 660 nm gemessen. Die Eichlösungen wurden ebenfalls mit 1 M KCl angesetzt.

B.5 Berechnungen

B.5.1 Berechnung der Stoffmenge aus Methan- und Ethylen-Mischungsverhältnissen

Um das Gasmischungsverhältnis (ppmv) von Methan in die Stoffmenge [mol] umzurechnen wurde die allgemeine Gasgleichung nach der Stoffmenge umgeformt.

$$n = \frac{p V}{R T}$$

n : Stoffmenge [mol]

p : Partialdruck des gemessenen Gases in [bar] (1 ppmv = 1×10^{-6} bar)

V : Volumen des Gasraumes im Reaktionsgefäß [l]

- R*: allgemeine Gaskonstante (0,083144 [l bar K⁻¹ mol⁻¹])
- T*: Temperatur in Kelvin (in den Versuchen 298,15°K)

Des Weiteren wurden die Stoffmengen auf Gramm Trockenboden bzw. Gramm Feuchtboden normiert.

B.5.2 Berechnung der Methan/Ethylenoxidations- und Methanproduktionsraten

Die Methanproduktionsraten wurden durch lineare Regressionsanalyse der mit der Zeit ansteigenden Methankonzentration in den Probengefäßen bestimmt. Die Steigungen wurden entweder über Excel 7.0 (Microsoft®, California) oder Origin 5.0 (Microcal, Software, Inc., North Hampton, U.S.A) berechnet.

Eine Oxidationsratenkonstante wurde mit dem Programm Excel 7.0 oder Origin 5.0 von der exponentiellen Abnahme des Methan/Ethylenmischungsverhältnisses mit der Zeit berechnet und in eine Methanoxidationsrate durch Multiplikation mit dem initialen Wert des Methanmischungsverhältnisses umgerechnet.

War die Abnahme der Methan/Ethylenkonzentration bei höheren Konzentrationen linear, erfolgte die Ratenbestimmung über lineare Regressionsanalyse und Ermittlung der negativen Steigung durch Excel 7.0 oder Origin 5.0.

C. Kapitel 1

Eisenoxiddüngung : Eine Strategie zur Verminderung der Methanemission aus gefluteten Reisfeldern ?

C.1 Thematischer Überblick und Zielsetzung.....	19
C.2 Material und Methoden.....	21
C.3 Ergebnisse.....	33
C.4 Diskussion.....	45

C.1. Thematischer Überblick und Zielstellung

Die Reduktion der anthropogenen Methanemission um mehr als 5% würde zu einer Stabilisierung der atmosphärischen Konzentration bzw. sogar zu einer Abnahme führen (IPCC, 1996; Dlugokencky et al., 1998) und so dem zunehmendem Treibhauseffekt entgegenwirken.

Die Kultivierung von Reis unter gefluteten Bedingungen hat durch die Emission von Methan einen signifikanten Anteil am Treibhauseffekt (s. allgemeine Einleitung). Die regulierenden Faktoren der Methanbildung und Methanemission wurden in den letzten Jahrzehnten intensiv untersucht. Viele Vermeidungsstrategien wurden vorgeschlagen (Sass et al., 1991; Wassmann, et al., 1993; Trolldenier, 1995; Erda et al., 1997; Buendia et al., 1997; Kern et al., 1997; Minami und Takata, 1997; Lantin et al., 2000) und auf ihre Effizienz, Wirtschaftlichkeit sowie der Ernteerträge und der Praktikierbarkeit untersucht (Yagi et al., 1997). Besonders intensiv waren die Studien zur Methanemissionsverminderung durch die Drainage des Feldes.

Dabei wurden u.a. die Dauer und der Zeitpunkt der Drainage auf die Methanemission aus geflutetem Reisfeldboden untersucht. Die Ergebnisse zeigen eindeutig, daß die Methanemission nach der Drainage drastisch vermindert ist (Kimura et al., 1991; Sass et al., 1992; Watanabe et al., 1995; Yagi et al., 1996, Bandyopadhyay et al., 1996; Mishra et al., 1997; Sigren et al., 1997; Rath et al., 1999). Neben dem Sauerstoffeintrag und der damit verbundenen Hemmung der Methanogenen spielt die Regeneration von Eisen (III) und Sulfat durch die Oxidation von Fe(II) und H₂S eine wichtige Rolle. Diese stehen den eisenreduzierenden und sulfatreduzierenden Bakterien als Elektronenakzeptor nach Wiederflutung erneut beim anaeroben Abbau von organischem Material zur Verfügung. Die Folge ist, daß erneut eine Konkurrenz um gemeinsame Substrate zwischen Sulfatreduzierern und Eisenreduzierern mit den Methanogenen stattfindet, was zur Verringerung der Methanemission führt (Sigren et al., 1997; Ratering und Conrad, 1998).

Auch der Zusatz der Elektronenakzeptoren wie Sulfat, Nitrat und Eisen(III) zu anoxischen Bodeninkubationen und Mikrokosmen hemmt die Methanproduktion (Lovley und Phillips, 1986;1987; Achtnich et al., 1995; Klüber, 1996; Inubushi et al., 1997; Klüber und Conrad, 1998; Koyama und Kimura, 1998; Watanabe und Kimura, 1999; Jäckel und Schnell 2000) und ist auf die oben erwähnte Konkurrenz um gemeinsame Substrate zurückzuführen. In diesem Zusammenhang steht auch die Beobachtung, daß in einem sulfatsauren Reisfeldboden, der wenig Methan emittierte, die Methanemission durch die Zugabe von Molybdat stimuliert wurde, da Molybdat als

Substratanalogen die sulfatreduzierenden Organismen im Boden hemmte (Ramakrishnan et al., 1998).

Der Einsatz von Ammoniumsulfat als Düngemittel zeigt eine deutliche Reduktion der Methanemission aus Reisfeldern (Kesheng und Zhen, 1997; Latin et al., 2000), die je nach Inkorporation des Düngers mehr oder weniger effizient ist (Schütz et al., 1989). Der Einsatz von Kaliumnitrat als Stickstoffdünger vermindert die Methanemission aus Reisfeldern (Lindau und Bollich, 1993; Lindau et al., 1993). Die Anwendbarkeit des Zusatzes von Elektronenakzeptoren im und als Dünger, zur Reduktion der Methanemission kann somit angenommen werden. Der Einsatz von Stickstoffdüngern kann neben der gesteigerten Substratkompetition auch eine Stimulation der Methanoxidation im Reisfeld bewirken und somit ebenfalls die Methanemission vermindern (Bodelier et al. 2000)

Der Zusatz von Eisen(III) und dessen Wirkung auf die Methanemission wurde bisher lediglich in Mikrokosmen getestet. Der Einsatz in Reisfeldern stand hingegen noch aus und war ein Projekt der vorliegenden Arbeit.

Durch Veränderungen der Art und Weise der Reiskultivierung sollte gerade hier eine Reduktion der Methanemission möglich sein. Die Strategien zur Vermeidung der Methanemission aus Reisfeldern sollten jedoch trotz der Reduktion der Methanemission einen gleichbleibenden Ernteertrag ermöglichen, sowie finanziell als auch praktisch durchführbar sein.

C.2. Materialien und Methoden

C.2.1 Herstellung von Ferrihydrit (modifiziert nach: Schwertmann und Cornell, 1991)

C.2.1.1 Kleine Ansätze:

In einem 5 Liter Becherglas wurden 1000 ml einer 0,25 M FeCl_3 -Lösung hergestellt. Zu dieser wurden dann unter kräftigem Rühren zügig, so daß die Suspension nicht zum Stocken kam, ca. 740 ml einer 1M NaOH Lösung geschüttet. Dabei wurde darauf geachtet, daß der pH-Wert nicht über 7 stieg. Es bildete sich ein rostbrauner Eisenhydroxidschlamm. Der pH-Wert wurde anschließend durch langsame Zugabe von 1 M NaOH auf 7,6 eingestellt und über einen Zeitraum von 60 min nachgeregelt. Zum Entfernen der Chlorid- und Natriumionen wurde die Suspension auf Zentrifugenbecher verteilt und bei 9700 g (Sorval SLA-3000, DuPont, Bad Homburg) abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet wurde in demineralisiertem Wasser resuspendiert und erneut abzentrifugiert. Dieser Waschprozeß wurde so lange wiederholt bis im Überstand mittels Chloridteststäbchen, (Merck, Darmstadt) kein Chlorid (≤ 14 mM) mehr nachgewiesen werden konnte. Über Trocknung von 5 ml Suspension bei 105°C bis zur Gewichtskonstanz wurde das Trockengewicht des Eisenhydroxides in der Lösung bestimmt.

C.2.1.2 Große Ansätze (für Felddüngung)

Anstelle des 5 l Becherglases wurde ein 120 l Plastikfaß mit Tragegriffen verwendet. Es wurden 70 l einer 0,25 M FeCl_3 -Lösung hergestellt, welche mit einer Bohrmaschine in Verbindung mit einem aus der Institutswerkstatt hergestellten Rührstab gerührt wurde. In einem 50 l Faß mit Auslaßhahn wurde 3 M NaOH hergestellt. Die Neutralisation der FeCl_3 -Lösung erfolgte durch Zugabe der NaOH über einen Gummischlauch unter kräftigem Rühren. Zur pH-Wert Messung wurde eine pH-Elektrode durch ein Plastikrohr in die Lösung geführt, so daß eine unkontrollierte Bewegung der Elektrode durch den starken Rührvorgang verhindert wurde. In einer 300 Liter Regentonne wurde das Ferrihydrit gewaschen, indem nach dem Absetzen des Ferrihydrits das Überstandswasser mit einem Schlauch entfernt wurde. Die Regentonne wurde erneut mit deionisiertem Wasser gefüllt und die Ferrihydritsuspension gerührt. Dieser Vorgang wurde so lange wiederholt, bis mittels Chlorid

Teststäbchen kein Chlorid mehr nachgewiesen werden konnte. Fünf Großansätze ergaben ca. 6 kg Ferrihydrit.

C.2.2 Mikrokosmosexperimente

C.2.2.1 Experimenteller Aufbau

Um den Einfluß von unterschiedlichen Ferrihydritkonzentrationen auf die Methanemission aus Reisfeldern zu untersuchen, wurden Mikrokosmen mit jeweils 5 Parallelen angesetzt. (Tab. C.2.1).

Tabelle C.2.1: Mikrokosmenansätze

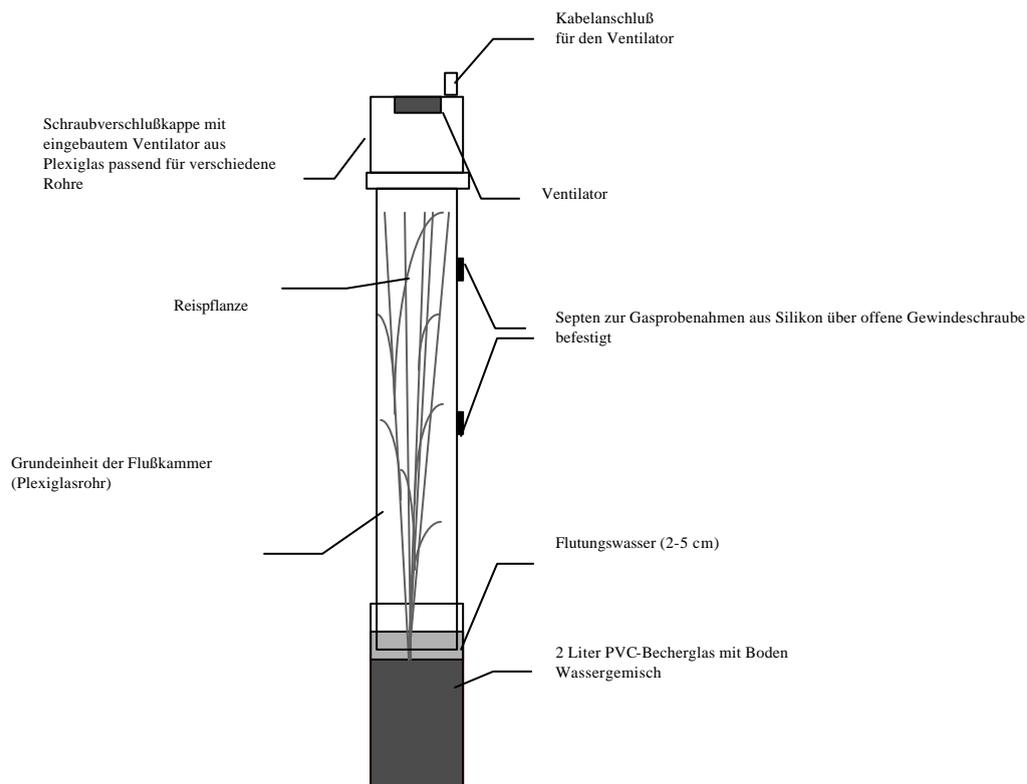
	Boden	Ferrihydrit
Kontrolle	1 kg Arborio	kein Zusatz
Ferrihydrit 1	1 kg Arborio	15 g Ferrihydrit
Ferrihydrit 2	1 kg Arborio	30 g Ferrihydrit

Der Boden wurde in 2 l Bechergläser (PE) gefüllt mit deionisiertem Wasser bis zur Sättigung gemischt und eine Woche im Gewächshaus unter gefluteten Bedingungen (2 - 5 cm Wasser Säule) inkubiert. Pro Becherglas wurde je ein vorgekeimter Reissämling gepflanzt. Jeder Ansatz wurde 6 Wochen nach der Pflanzung mit 2,6 mmol $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, Stickstoff und Phosphat gedüngt.

C.2.2.2 Methanflußmessungen

Zur Bestimmung der Methanemission aus den Ansätzen wurden die ansteigende Methankonzentration in Flußkammern gemessen, die über die Pflanzen gestülpt waren und zur Abdichtung ins Flutungswasser getaucht wurden (Abb. C.2.1).

Abbildung C.2.1: Flußkammeraufbau zur Methanmessung im Mikrokosmenexperiment



Fünf bis sechs Meßpunkte wurden über einen Zeitraum von 30 bis 45 min zu sechs verschiedenen Zeitpunkten während der Vegetationsperiode gemessen. Die Flußkammern (Abb. C.2.1) bestanden aus einem Plexiglasrohr und einem Schraubverschlußdeckel aus Plexiglas. Die Kombination von Schraubdeckel mit einem von zwei unterschiedlich langen Plexiglasrohren erlaubte eine Anpassung der Flußkammer an die Pflanzengröße. Ein Ventilator im Deckel sorgte für eine optimale Durchmischung der Atmosphäre in der Flußkammer. An die Rohre angebrachte und austauschbare Silikonsepten ermöglichten die Probenentnahme. Diese erfolgte über Einmalspritzen (1ml) mit Kanülen. Nach der Gasprobenentnahme wurden die Spritzen mit Kanüle in einen Gummistopfen

gesteckt, um eine Abdichtung zu gewährleisten. Die Methankonzentration wurde gaschromatographisch bestimmt. Die Emissionsberechnung erfolgte über die Ermittlung der Steigung des Konzentrationsanstieges von Methan. Die Auswertung wurde mit Hilfe des Auswertungsprogramms Microsoft Excel über lineare Regression durchgeführt. Die ermittelte Methanemission wurden in $\mu\text{mol m}^{-2} \text{h}^{-1}$ umgerechnet.

C.2.2.3 Eisenbestimmung des Bodens

Mit einer Kolbenhubpipette (2,5 ml, Eppendorf, Hamburg) wurde 146 Tage nach dem Einsetzen der Pflanzen aus jedem Becherglas zwischen Becherglasrand und Pflanze aus einer Tiefe von 5 cm ein Aliquot Boden-Wassergemisch pipetiert. Dieses wurde in zwei Aliquote aufgeteilt. Ein Teil wurde in ein mit 4,5 ml 0,5 M HCl gefülltes verschließbares Plastikreagenzröhrchen überführt, dessen Gewicht vorher bestimmt wurde, der zweite Teil wurde in eine Aluschale ebenfalls bekannten Gewichtes transferiert. Die anschließende Gewichtsbestimmung des Reagenzröhrchens gab an, wieviel Boden-Wassergemisch in die HCl überführt wurde. Die Differenz aus Alu-Schälchen und Boden-Wassergemisch vor und nach Trocknung erlaubte die Feststellung des Anteils an Porenwasser jeder Probe und damit die Berechnung des Anteiles an Wasser und Boden in der HCl-Lösung.

Um das 0,5 M HCl lösliche Eisen(II) und (III) vollständig zu extrahieren wurden die Röhrchen bei Raumtemperatur über 24 h inkubiert. Von diesem HCl-Boden-Wasser Gemisch wurde 0,1 ml in ein Reaktionsgefäß überführt und 1:10 mit 0,5 M HCl verdünnt. Eine gegebenenfalls erforderliche Vorverdünnung erfolgte mit 0,1 M HCl. Die so verdünnten Proben wurden vor der Messung 5 min mit 6450 g (Zentrifuge, Hettich) abzentrifugiert und der Überstand in neue Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt. Eisen(II) und -(III) wurden mittels Ionenchromatographie bestimmt. Die gemessenen Werte (μM) wurden anschließend in $\mu\text{mol pro Gramm trockener Boden (g-TB}^{-1})$ umgerechnet.

C.2.2.4 Trockengewichtsbestimmung der Pflanzen

Die Pflanzenwurzeln wurden mit Wasser abgewaschen und vollständig vom Bodenmaterial befreit. Das Gewicht wurde nach Trocknung (bei 80°C) bis zur Gewichtskonstanz bestimmt.

C.2.2.5 Eisenbestimmung auf der Wurzeloberfläche

Die getrockneten Wurzeln eines Ansatzes wurden in einen 1 Liter Erlenmeyerkolben gegeben. Zur Extraktion der Eisenoxide von der Wurzeloberfläche wurden 850 ml 0,5 M HCl-Lösung zu den Wurzeln gegeben. Die Extraktionszeit betrug 36 h bei Raumtemperatur.

C.2.3 Feldexperimente

C.2.3.1 Experimenteller Aufbau und Feldbeschreibung

Das Feldexperiment wurde zwischen April und Oktober im Jahr 1999 durchgeführt. Die agrarwirtschaftlichen Bearbeitungen des Versuchsfeldes erfolgte durch Mitarbeiter des Reisforschungsinstituts (Tab. C.2.2).

Tabelle C.2.2: Agrarwirtschaftliche Maßnahmen

Datum	Bearbeitung	Behandlung
20.04.99	Feld gepflügt und geebnet	
21.04.99	Feld wieder aufgelockert und Feld gedüngt	100 kg Phosphat/ha 80 kg Harnstoff/ha 150 kg Kalium/ha
	Eisen spatentief (ca. 24 cm) untergegraben siehe Bild 1a-c	ca. 1,5 kg m ⁻² Ferrihydrit auf eine Fläche von 2 x 2 m
12.05.99	Flutung	
14.05.99	Saat Unterart: Koral, Sorte: Japonica	
9-16.06.99	Kurzzeitige Drainage	Herbizid Behandlung
Oktober	Ernte	

Das Feld befand sich direkt vor dem „Istituto Sperimentale per la Cerealicoltura“ in Vercelli (Po-Ebene, Oberitalien). Innerhalb eines Feldes (6 x 15 m) wurde eine kleine Fläche von 2 x 2 m durch Einarbeiten (Bild C.2.1) des Ferrihydrit-Wassergemischs mit Eisen(III) versetzt (Abb. C.2.2). Der eisengedüngte Bereich war über Stege von beiden Seiten her erreichbar, während der Meßbereich im Kontrollfeld an nur einem Steg lokalisiert war (Abb. 2).

Abbildung C.2.2: Skizze zur Feldübersicht

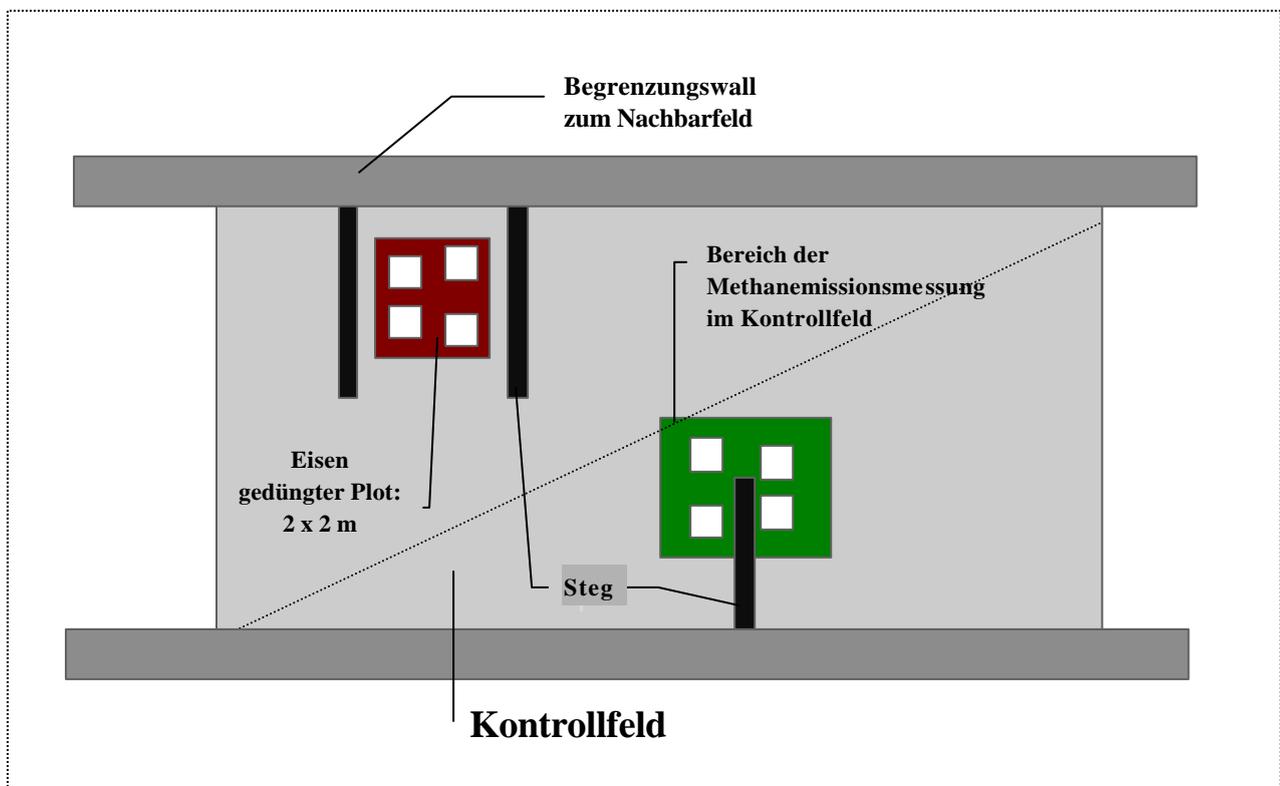
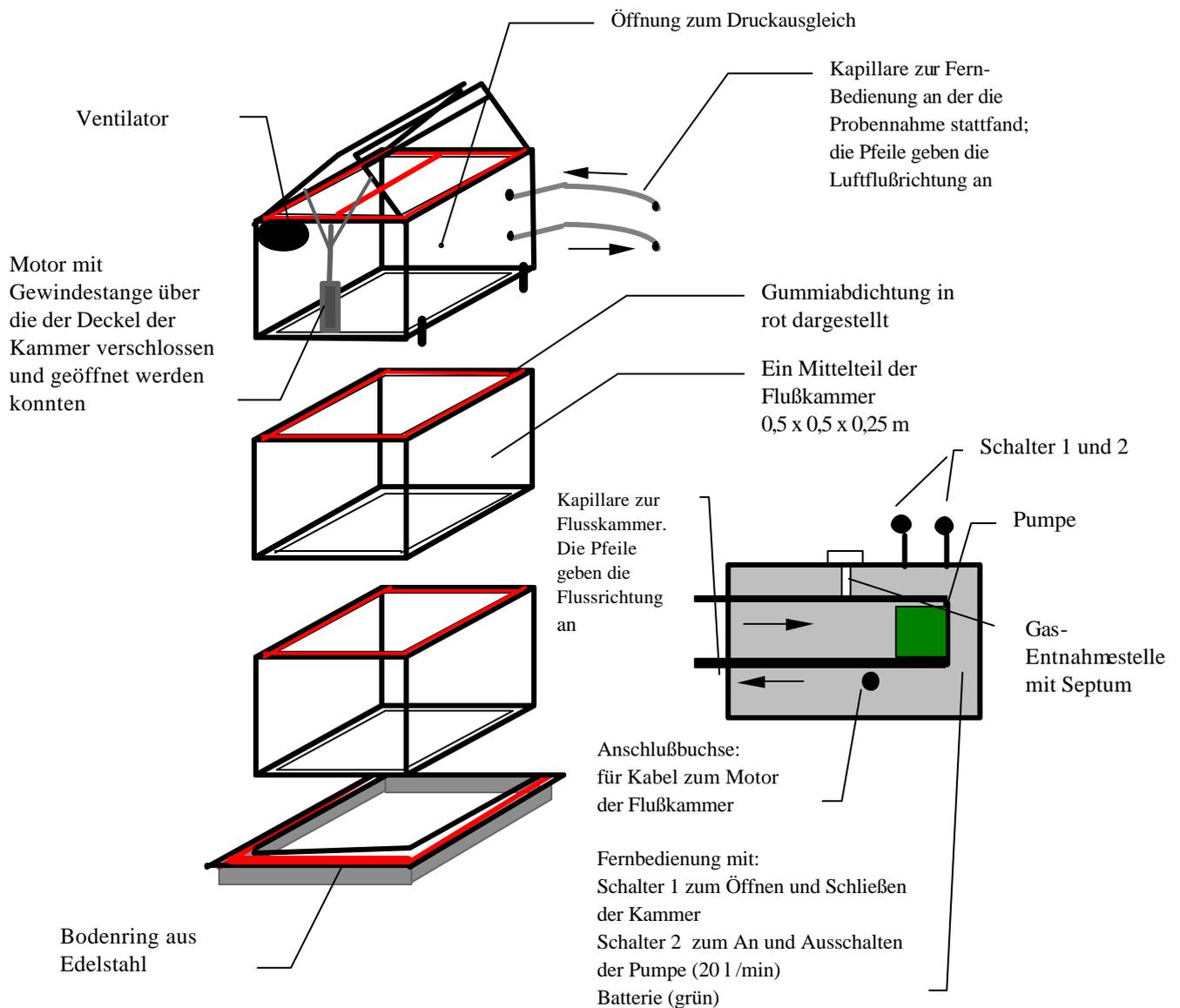


Bild C.2.1 (A-C): Einbringen des Eisenoxides

C.2.3.2 Methanflußmessungen

Methanemissionsmessungen wurden zu drei unterschiedlichen Zeitpunkten während der Vegetationsperiode durchgeführt. Die erste Messung am 25.06. fand während der Wachstumsphase statt. Die zweite Messung am 17.07. während der Blütezeit und die letzte Messung am 20.08. während der Reifungsphase der Reiskörner. Zu jedem Meßtermin wurde eine Vormittagsmessung (10 - 13 Uhr) und eine Nachmittagsmessung durchgeführt (16 - 20 Uhr).

Abbildung C.2.3: Aufbau des Flußkammersystems



Am Abend vor der Messung wurden jeweils 4 Bodenringe in die beiden Meßfelder plziert, so daß sie komplett unter der Wasseroberfläche waren. Am folgenden Morgen wurde das Flußkammersystem bestehend aus Mittelteilen, die Anzahl wurde nach Pflanzenhöhe variiert, und Deckel auf die Bodenringe aufgesetzt. Da nur 4 Kammern mit integriertem Ventilator zur Verfügung standen, wurden je zwei auf das Kontroll- und das Versuchsfeld gesetzt. Nach der Messung wurden die Kammern auf die beiden anderen Bodenringe gestellt. Am Spätnachmittag wurde der Vorgang wiederholt.

Über eine Fernbedienung (Abb. C.2.3) wurden die Flußkammern mechanisch verschlossen und dabei automatisch der Ventilator angeschaltet. Die in der Fernbedienung vorhandene Pumpe erzeugte einen Luftstrom von 20 Litern pro Minute, der aus der Flußkammer über ein PE-Kapillare zur Fernbedienung und durch eine zweite Kapillare von dort zurückfloß. Über eine Probennahmestelle an der Fernbedienung, die mit einem Naturgummiseptum verschlossen war, konnten 1 ml Gasproben entnommen werden. Die Probennahme erfolgte über einen Zeitraum von 30 - 40 Minuten, in denen 5-6 Proben entnommen wurden. Die gefüllten Spritzen wurden mit der Kanüle auf einen Gummistopfen gesteckt und so bis zur Methanmessung im Institut gasdicht verschlossen. Die Messung erfolgte innerhalb einer Stunde nach der letzten Probennahme.

C.2.3.3 Agrophysiologische Datenerfassung

Die agrophysiologischen Daten wurden von Mitarbeitern des Reiszüchtungsinstitutes in Vercelli in vier Parallelen von je 0,25 m² auf dem eisengedüngten sowie dem Kontrollfeld bestimmt. Folgende Daten wurden erfasst:

1. Kornertrag
2. Strohertrag
3. Pflanzenhöhe
4. Ährenlänge
5. Ernte-Index (Kornertrag/Biomasse)
6. Korn-Eiweiß-Gehalt
7. Pflanzen Dichte
8. Wassergehalt während der Ernte

Zusätzlich wurde die Dauer bis zur Blüte und die Dauer der Blüte erfaßt.

C.2.3.4 Keimungsfähigkeit der geernteten Reiskörner

Um die Keimungsfähigkeit der geernteten Reiskörner von der Kontrolle und dem eisengedüngten Feld zu vergleichen wurden je 50 Körner von vier ausgewählten Parallelen auf 3 Lagen Fließpapier, welches vorher mit Leitungswasser gesättigt wurde, verteilt. Die Inkubation erfolgte bei 30°C in Dunkelheit. Nach 6 Tagen wurde die Anzahl der gekeimten Körner bestimmt. Nach weiteren 3 Tagen war keine Veränderung zur ersten Zählung detektierbar.

C.2.3.5 Analyse von Kupfer, Eisen, Magnesium und Mangan in Reiskörnern und Reispflanzen

Die Pflanzen (vier Parallelen, ohne Wurzeln) aus den beiden Versuchsfeldern wurden in Blatt und Stiel unterteilt und mit einer Schere auf ca. 1 cm Länge zerkleinert. Das Probenmaterial wurde ca. 12 Stunden bei 80°C getrocknet und dann pulverisiert. Je 1 g ($\pm 0,05$ g) wurde in ein Porzellan- oder Quarzgefäß eingewogen und im Muffelofen ca. 3 Stunden bei 475 bis 500°C verascht. Nach dem Abkühlen wurde die Asche in 5 ml Salzsäure aufgenommen und durch einen mit Säure ausgewaschenen Filter in ein 50 ml Meßkolben filtriert. Das Filterpapier wurde mit heißem destilliertem Wasser nachgewaschen und bis zur Eichmarke aufgefüllt.

Die Bestimmung der Elemente erfolgte mittels Flammen-Atomabsorptionsspektrometrie. Die Veraschung und Analysen wurden von der Firma Wartig Chemieberatung GmbH (Lahntal, Sterzhausen) durchgeführt.

C.2.4. Berechnung der Eisenkonzentration

C.2.4.1 Wurzel: $\mu\text{mol g-TW}^{-1}$

Die mit Hilfe der Eichgeraden des Ionenchromatographen ermittelten Mikromolaritäten [μM] der HCl-Extraktionslösungen wurden mit folgender Formel in Mikromol pro Gramm Trockensubstanz Wurzel umgerechnet.

$$W = \frac{M}{1000} \frac{V_{extr}}{G_{wu}} n$$

- W : Mikromol pro Gramm Trockengewicht Wurzel [$\mu\text{mol g-TW}^{-1}$]
- M : mit Hilfe der Eichgeraden ermittelte Mikromolarität im Bodenextrakt
- V_{extr} : Volumen der 0,5 M HCl-Lösung, in dem die Wurzeln extrahiert wurde
(im Versuch 850 ml)
- G_{wu} : Gewicht der Wurzel Probe in Gramm Trockengewicht
- n : Verdünnungsfaktor aus der eventuellen Vorverdünnung mit 0,5 M HCl

C.2.4.2 Boden: $\mu\text{mol g-TB}^{-1}$

Die mit Hilfe der Eichgeraden des Ionenchromatographen ermittelten Mikromolaritäten wurden mit folgender Formel in Mikromol pro Gramm Trockenboden umgerechnet.

$$K = \frac{M}{1000} \left(\frac{(V_{extr} + V_{po})}{(S - G_{po})} \right) n$$

- K : Mikromol pro Gramm Trockenboden [$\mu\text{mol g-TB}^{-1}$]
- M : mit Hilfe der Eichgeraden ermittelte Mikromolarität [μM] im Bodenextrakt
- V_{extr} : Volumen der 0,5 M HCl-Extraktionslösung, in das die Probe nach der Entnahme pipettiert wurde (im Versuch 4,5 ml)
- V_{po} : Volumen des Porenwassers in ml, das über den gravimetrischen Wassergehalt einer Referenzprobe berechnet wurde
- S : Gewicht der Boden-Wasser-Probe in Gramm (gravimetrisch bestimmte Differenz der HCl-Röhrchen ohne und mit Probe)
- G_{po} : Gewicht des Porenwassers in Gramm, das über der gravimetrischen Wassergehalt einer Referenzprobe berechnet wurde

n : Verdünnungsfaktor aus der eventuellen Vorverdünnung mit 0,5 M HCl

C.2.5 Statistische Auswertung

C.2.5.1 Spurenelemente: Reispflanzen, Körner und agrophysiologische Daten

Die einzelnen zu vergleichenden Datensätze wurden mit dem Programm Excel auf Signifikanz hin untersucht. Hierfür wurde eine einfaktorische Varianzanalyse (ANOVA=analysis of variance) durchgeführt.

C.2.5.2 Methanemission

Mit Hilfe des Programms Systat 9 (Firma SPSS Inc. Chicago IL, U.S.A.) wurden die Methanemissionen durch eine mehrfaktorische ANOVA-Berechnung auf Signifikanz hin untersucht.

C.2.6 Anionenadsorption an Ferrihydrit

Die Fähigkeit von Eisenoxiden als Ionenaustauscher im Boden zu wirken, ist ein bekanntes Phänomen. Ob Ferrihydrit ebenfalls einen Einfluß auf die Porenwasserkonzentration von unterschiedlichen Ionen hat, sollte untersucht werden. Hierfür wurden 3,3 g Boden mit 3,3 g demineralisiertem Wasser 2 Minuten lang geschüttelt und die Sulfat und Acetatkonzentration im Porenwasser ionenchromatographisch bestimmt. Der Boden wurde 5 min mit 6450 g (Zentrifuge, Hettich) in einem Reaktionsgefäß (2 ml; Eppendorf; Hamburg) abzentrifugiert und der Überstand in neue Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt. In weiteren Ansätzen wurde zu 3,3 g Boden entweder 50 mg, 100mg oder 200 mg Ferrihydrit gegeben und diese Ansätze ebenfalls mit demineralisiertem Wasser 2 Min geschüttelt, um anschließend die Konzentration von Acetat und Sulfat zu analysieren. Um eine Adsorption zu verhindern, wurden im Falle der Sulfatadsorption parallel an Stelle von Wasser mit 100 mM Natriumcarbonat und im Falle der Acetatadsorption mit 100 mM Natriumsulfat 2 Min lang geschüttelt und die Extraktionslösung ionenchromatographisch auf die entsprechenden Ionen hin untersucht. Alle Ansätze wurden in dreier Parallelen gemacht.

C.3 Ergebnisse

Bei der Untersuchung sequentieller Redoxprozesse wurde in Bodenaufschlämmungen eine verringerte Methanproduktion nach Zugabe von Ferrihydrit festgestellt. In Mikrokosmen- und Feldexperimenten sollte nun untersucht werden, ob der Einsatz von Ferrihydrit ein geeignetes Mittel zur Verminderung der Methanemission aus gefluteten Reisfeldern ist. Hierbei wurde auch der Einfluß des eingesetzten Eisenhydroxides auf wichtige agrophysiologische Parameter untersucht.

C.3.1 Methanemissionen

Die Mikrokosmenexperimente im Gewächshaus zeigten, daß die Methanemissionen in den beiden Ansätzen, denen Ferrihydrit zugesetzt wurde, deutlich geringer waren als die der Kontrolle (Abb. C.3.1 und Tab. C.3.1). Der Kontrollansatz ohne Ferrihydrit zeigte bereits am 60. Tag maximale Methanemission mit $3800 \mu\text{mol m}^{-2} \text{h}^{-1}$, die bis zum 109. Tag anhielt, während die Methanemission im Ansatz mit 15 g Ferrihydrit pro kg Reisfeldboden kontinuierlich bis zum 109. Tag auf $3100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{h}^{-1}$ anstieg und ein Maximum erreichte. Der Kontrollansatz und auch der Ansatz mit 15 g Ferrihydrit pro kg Boden zeigten am 143. Tag eine deutlich verminderte Methanemission zur vorherigen Messung (Abb. C.3.1). Im Gegensatz dazu nahm die Methanemission vom 21. bis zum 60. Tag im Ansatz mit 30 g Ferrihydrit pro kg Boden von $173 \mu\text{mol m}^{-2} \text{h}^{-1}$ auf $19 \mu\text{mol m}^{-2} \text{h}^{-1}$ ab und stieg dann kontinuierlich bis zum 143. Tag auf $1240 \mu\text{mol m}^{-2} \text{h}^{-1}$ an (Abb. C.3.1).

Um einen quantitativen Vergleich der Methanemissionen machen zu können, wurde durch Integration der Messungen über den Zeitraum von 143 Tagen eine Abschätzung der Gesamtemission gemacht. Dies zeigte, daß die Methanemission um 43% bzw. 84,5% in den Ansätzen mit Ferrihydrit verringert wurde (Tab. C.3.1).

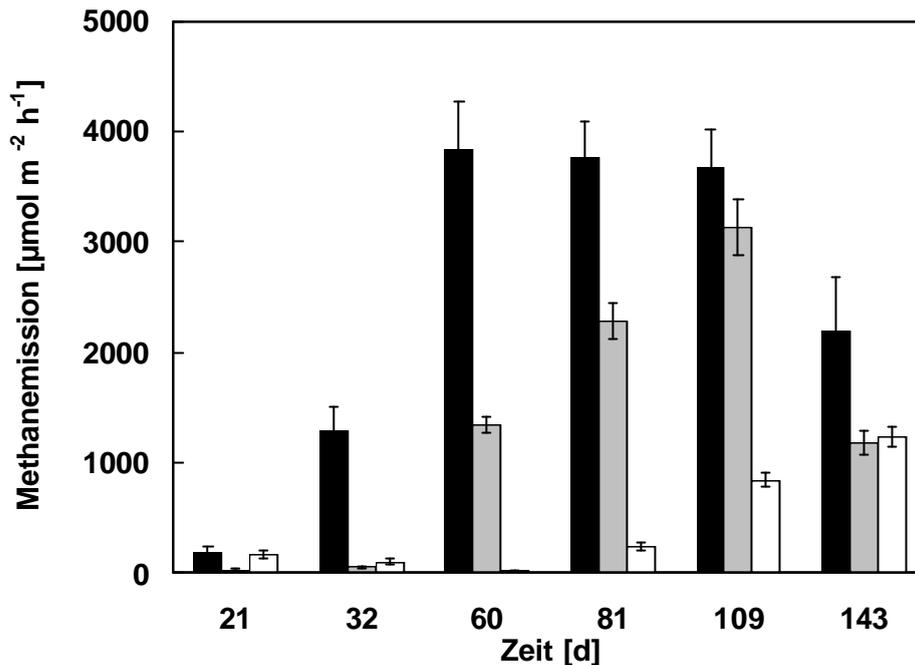


Abb. C.3.1: Methanemissionen zu unterschiedlichen Vegetationszeitpunkten nach dem Einsetzen der Reissämlinge. Mikrokosmen ohne Zusatz (**schwarz**), mit 15 g (**grau**) und 30 g (**weiß**) Ferrihydrit pro kg Boden. Die Balken zeigen Mittelwerte von $n=5 \pm SE$.

Tabelle C.3.1: Gesamtmethanemission aus Mikrokosmosmen über einem Zeitraum von 143 Tagen in Abhängigkeit von der Ferrihydritkonzentration. Die Gesamtemission wurde durch Integration der Meßreihe berechnet. Die Werte sind Mittelwerte von $n = 5 \pm SE$. Die Homogenität der Varianzen innerhalb der Ansätze wurde getestet (Levene Statistik ($P = 0,117$)). Die Gesamtmethanemission jeden Ansatzes war signifikant zu den beiden anderen verschieden (one way ANOVA $P < 0,001$, nach mehrfach vergleichender Bonferroni Methode).

Ansatz		Kontrolle	15 g Ferrihydrit pro kg Boden	30 g Ferrihydrit pro kg Boden
Methanemission in				
143 Tagen pro m²	[g]	$139,6 \pm 14,1$	$79,7 \pm 4,1$	$21,7 \pm 0,6$
Methanemission in	[%]	100	57,1	15,5

Auch im Feldexperiment konnte gezeigt werden, daß die Methanemission auf dem eisengedüngten Bereich deutlich verringert war. Zu allen Messzeitpunkten wurden geringere Emissionsraten detektiert (Abb. C.3.2).

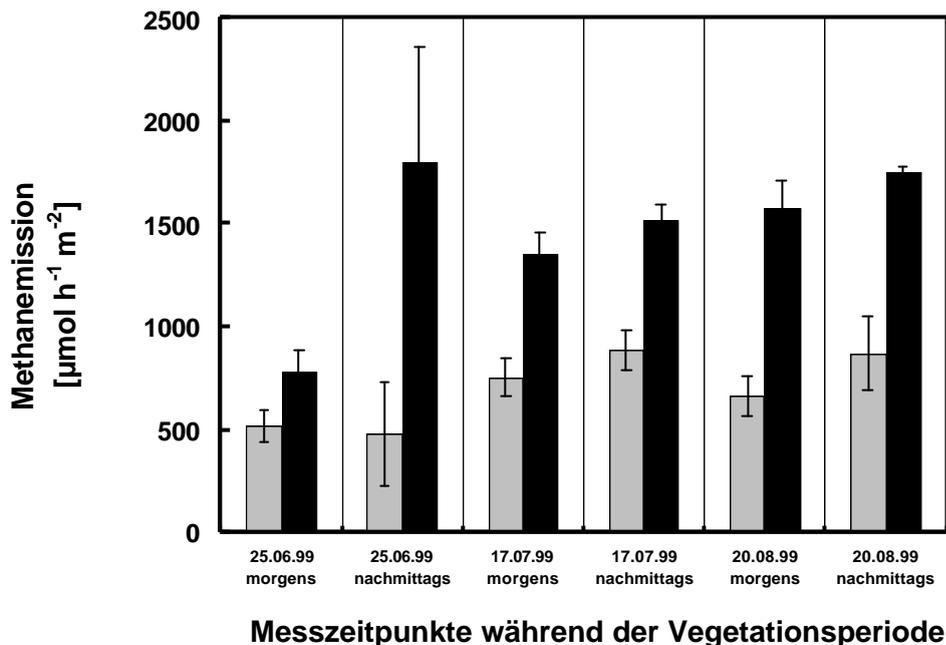


Abb. C.3.2: Methanemissionen zu 3 unterschiedlichen Zeitpunkten während der Vegetationsperiode (1999) mit jeweils einer Morgen- und einer Nachmittagsmessung aus einem Reisfeld in Vercelli (Oberitalien). Hierbei stellt der 25.06 die Wachstumsphase, der 17.07 die Blütezeit und der 20.08. die Reifephase dar. Die Methanemission wurde auf Teilflächen von 4 x 0,25 m² in einem Feld ohne Zusatz (**schwarz**) und einem Bereich (2 x 2 m) mit 1,5 kg Ferrihydrit pro m² angereicherten Boden (**grau**) gemessen. Die Balken sind Mittelwerte von n=4 ± SE. Die Methanemission der beiden Ansätze war Signifikant (P < 0,001) verschieden.

Um die Verringerung der Methanemission aus dem Feldexperiment zu bestimmen wurden zu jedem Meßzeitpunkt die Werte miteinander verglichen. Hierbei wurde die Kontrolle gleich 100% Methanemission gesetzt. Die verringerte Methanemission wurde nun in Prozent umgerechnet und die Werte der drei Meßzeitpunkte gemittelt. Daraus ergab sich eine um 50,3% verringerte Methanemission in Anwesenheit von Ferrihydrit.

C.3.2 Eisenkonzentrationen am Ende des Mikrokosmenexperimentes

Nach 143 Tagen wurde die Eisen(II)- und Eisen(III)konzentration bestimmt, um die Reduktion des eingesetzten Ferrihydrits zu bestimmen. Die ermittelten Werte wurden in den verschiedenen Ansätzen verglichen (Tab. C.3.2). Im Ansatz mit 15 g Ferrihydrit pro kg Boden wurden $249 \pm 28 \mu\text{mol}$ 0,5 M HCl extrahierbares Gesamteisen pro Gramm trockenem Boden detektiert. Im Vergleich zum errechneten theoretischen Wert mit $231,1 \mu\text{mol}$ Gesamteisen pro Gramm trockenem Boden war die Wiederfindung 108%. Im Ansatz mit 30 g Ferrihydrit wurden lediglich 75,5%, der theoretisch zu erwartender Gesamteisenkonzentration ($371 \mu\text{mol g-TB}^{-1}$), detektiert (Tab. C.3.2).

Tabelle C.3.2: 0,5 M HCl-extrahierbare Gesamteisenkonzentrationen, im Boden von Reismikrokosmen, die 143 Tage im Gewächshaus inkubiert wurden in Abhängigkeit von zugesetztem Ferrihydrit. Die gemessenen Werte entsprechen Mittelwerten von $n = 5 \pm \text{SD}$.

	Internes Gesamteisen	Zugesetztes Fe (III)	Internes + zugesetzt (berechnet) Gesamteisen	Gemessenes Gesamteisen
	[$\mu\text{mol g-TB}^{-1}$]	[$\mu\text{mol g-TB}^{-1}$]	[$\mu\text{mol g-TB}^{-1}$]	[$\mu\text{mol g-TB}^{-1}$]
Boden	91 ± 8	0	91	91 ± 8
+15 g Ferrihydrit pro kg Boden	91 ± 8	140	231	249 ± 28
+30g Ferrihydrit pro kg Boden	91 ± 8	280	371	280 ± 46

Da Fe^{2+} bei hohen Konzentrationen im Wurzelraum toxisch auf Pflanzen wirken kann, wurde sowohl die Eisen(II) als auch die Eisen(III)konzentration auf der Wurzel und im Boden bestimmt.

Die Analyse von Eisen(II) und Eisen(III) auf der Reiwurzeloberfläche zeigte, daß die Eisen(III)-Konzentration mit steigender Ferrihydritkonzentration im Boden von $148 \mu\text{mol g-TW}^{-1}$ auf $304,6 \mu\text{mol g-TW}^{-1}$ anstieg, während die Eisen(II)-Konzentrationen mit $29 - 40 \mu\text{mol g-TW}^{-1}$ in allen Ansätzen nur wenig anstieg (Abb. C.3.3 A).

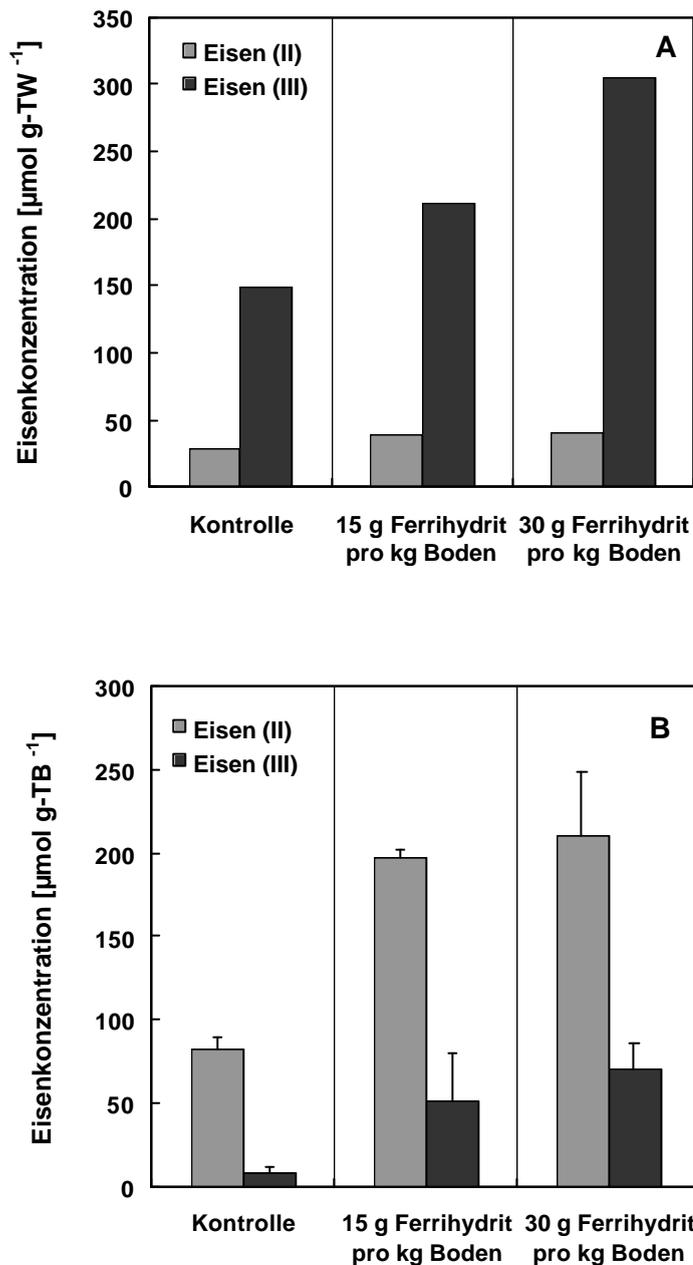


Abb. C.3.3: Konzentrationen von 0,5 M HCl extrahierbaren Eisen(II) und (III) der Reiszurzeloberfläche (A) und dem Boden (B) aus Mikrokosmen mit unterschiedlichem Ferrihydritanteil. Die Mikrokosmen wurden 143 Tage im Gewächshaus inkubiert. Bei den Konzentrationen der Wurzeloberfläche handelt es sich um Einzelmessungen und bei den Eisenkonzentrationen aus dem Boden um Mittelwerte von $n=5 \pm \text{SD}$.

In den Ansätzen mit Ferrihydrit war die Eisen(II)konzentration im Boden von 143 Tage alten Reismikrokosmen deutlich größer als im Boden ohne Zusatz. So wurden $197\text{--}210 \mu\text{mol g-TB}^{-1}$ in den Ansätzen mit Ferrihydrit gemessen, während im Kontrollboden nur $82 \mu\text{mol g-TB}^{-1}$ detektiert wurden (Abb. C.3.3B).

Die Eisen(III)konzentrationen im Boden der Ansätze mit 15 g und 30 g Ferrihydrit pro kg Boden waren 52 und 70 $\mu\text{mol g}^{-1}\text{TB}^{-1}$ und damit gegenüber der Kontrolle (8,7 $\mu\text{mol g}^{-1}\text{TB}^{-1}$) deutlich höher (Abb. C.3.3B).

C.3.3 pH-Wert und Redoxpotential im Mikrokosmosexperiment

Der pH-Wert in den Ansätzen mit Ferrihydrit war nach 143 Tagen Inkubation mit 6,83 und 7,18, um 0,3 bzw. 0,7 Einheiten höher als die Kontrolle (Tab. C.3.3).

Das Redoxpotential war zu diesem Zeitpunkt in den Ansätzen ohne und mit 15 g Ferrihydrit pro kg Boden mit -256 mV und -252 mV ähnlich. Der Wert im Ansatz mit 30 g Ferrihydrit pro kg Boden war jedoch deutlich niedriger (-316 mV) (Tab. C.3.3).

Tabelle C.3.3: pH-Wert und Redoxpotential nach 143 Tagen Inkubation von Reispflanzen in Mikrokosmen in Abhängigkeit von extern zugesetztem Ferrihydrit. Gemessen wurde in einer Bodentiefe von 5 cm im wurzelfreien Raum der Mikrokosmen. Die Werte entsprechen Mittelwerten von $n = 5 \pm \text{SD}$.

	pH-Wert	Redoxpotential [mV]
Boden	6,54 \pm 0,07	-252 \pm 13
+15 g Ferrihydrit pro kg Boden	6,83 \pm 0,08	-256 \pm 22
+30 g Ferrihydrit pro kg Boden	7,18 \pm 0,03	-316 \pm 8

C.3.4 Anionenadsorption im Boden und an Ferrihydrit

Um zu überprüfen, ob zugesetztes Ferrihydrit einen Einfluß auf die Anionenkonzentration im Boden haben kann, wurden Acetat- und Sulfatkonzentrationen durch Wasserextraktionen von Reisfeldboden bestimmt, dem unterschiedliche Mengen Ferrihydrit zugesetzt wurde. Eine eventuelle Adsorption sollte in einem weiteren Experiment durch die Extraktion mit entsprechenden kompetitiven Anionen verhindert und somit untersucht werden.

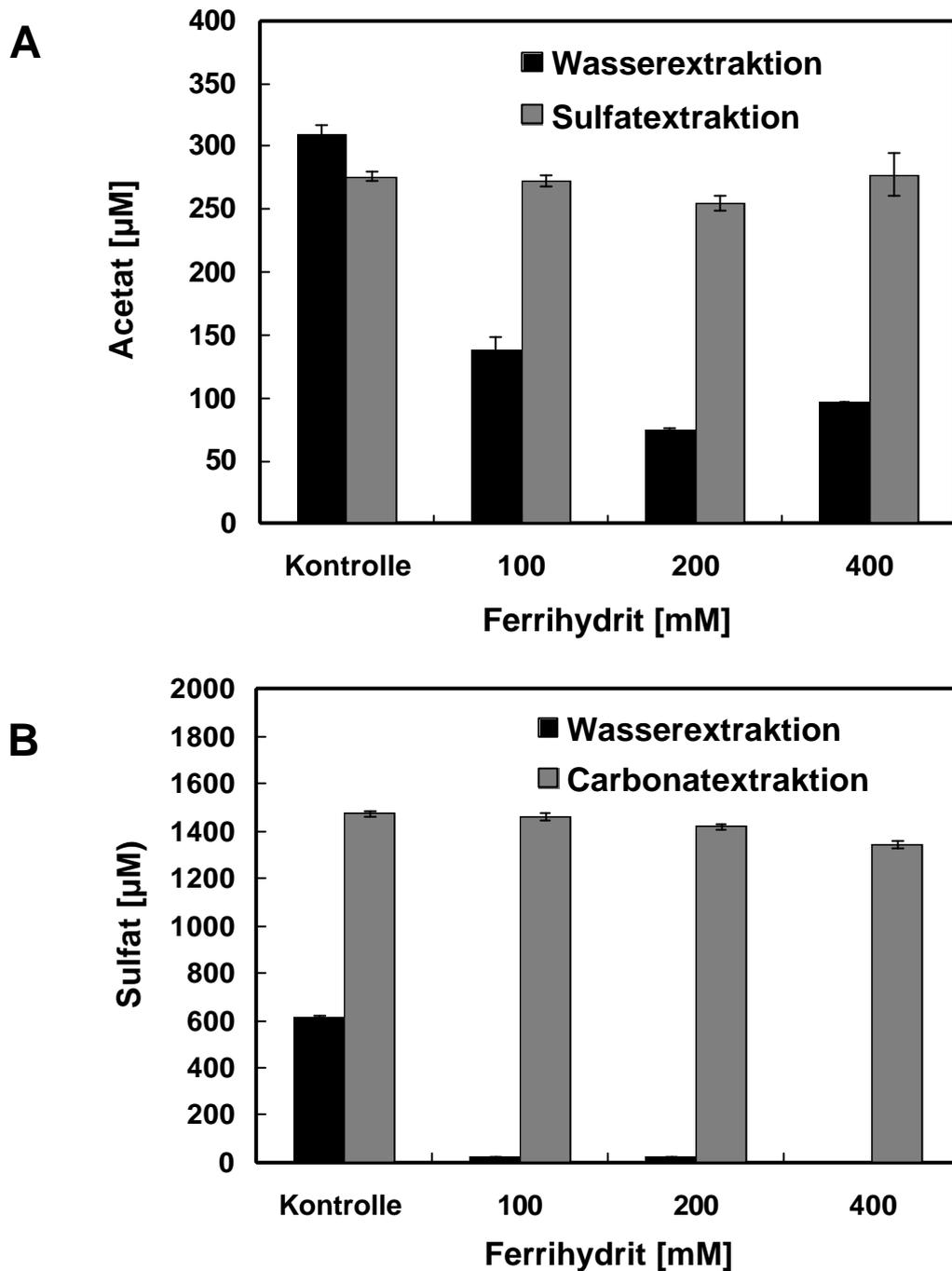


Abb. C.3.4: Vergleich der Acetatkonzentrationen (**A**) und Sulfatkonzentrationen (**B**) in Reisfeldboden, (Arborio) dem kein, 100 mM, 200 mM oder 400 mM Ferrihydrit zugesetzt wurden. Verschiedene Extraktionsmethoden wurden verglichen. In (**A**) Wasserextraktion und Sulfatextraktion und (**B**) Wasserextraktion und Carbonatextraktion. Die Werte sind Mittelwerte von $n=2$. Die Fehlerbalken zeigen den jeweils maximalen und minimalen Wert.

Die Experimente zeigen, daß die Sulfatkonzentrationen und die Acetatkonzentrationen im Boden mit steigender Ferrihydritkonzentration deutlich abnehmen (Abb. C.3.4). Die Extraktion mit 100 mM Carbonat und mit 100 mM Sulfat zeigte, daß die entsprechenden Sulfat- und Acetatkonzentrationen in allen Ansätzen gleich waren (Abb. C.3.4). Im Falle von Sulfat wurde durch die Carbonatextraktion sogar eine fast 1,5fach höhere Sulfatkonzentration im Boden ohne Ferrihydrit detektiert als mit der Wasserextraktion. Dies zeigt die Sulfatadsorption an Bodenbestandteile.

C.3.5 Agrophysiologische Daten und Pflanzenwachstum

Aufgrund einer „Eisendüngung“ zur Verminderung der Methanemission aus Reisfeldern können erhöhte Eisen(II)konzentrationen auftreten, was das Wachstum der Reispflanze negativ beeinflusst. Um diesen Aspekt zu untersuchen, wurde bei den Mikrokosmen sowohl die Pflanzenmasse als auch die Kornzahl pro Pflanze bestimmt. Für das Feldexperiment wurden wichtige agrophysiologischen Daten durch das Reiszüchtungsinstitut in Vercelli analysiert.

Im Mikrokosmensexperiment war die Kornzahl pro Pflanze im Ansatz mit 30 g Ferrihydrit pro kg Boden um 18% vermindert, während mit 15 g Ferrihydrit pro kg Boden kein Unterschied detektiert werden konnte (Tab. C.3.4). Das Trockengewicht der Reispflanzen war in Anwesenheit von 15 und 30 g Ferrihydrit verglichen zur Kontrolle, von 23,1 g auf 16,1 bzw. 12,1 g, vermindert (Tab. C.3.4). Im Gegensatz dazu war der Strohertrag im Feldexperiment durch den Ferrihydritzusatz nicht verändert (Tab. C.3.5).

Im Feldexperiment zeigten die agrophysiologischen Daten nur geringe Unterschiede zwischen den beiden Ansätzen (Tab. C.3.5).

Tabelle C.3.4: Trockengewicht und Anzahl der Körner aus Reismikrokosenexperimenten in Abhängigkeit der zugefügten Ferrihydritmenge. Die Werte entsprechen Mittelwerten von $n = 5 \pm \text{SD}$. Das Trockengewicht jeden Ansatzes war signifikant zu den beiden anderen verschieden (One way ANOVA $P < 0,01$). Die Anzahl der Reiskörner im Ansatz mit 30 g Ferrihydrit war signifikant ($P < 0,01$) verschieden zu den beiden anderen Ansätzen.

	Kontrolle	15 g Ferrihydrit pro kg Boden	30 g Ferrihydrit pro kg Boden
Trockengewicht [g] pro Pflanze	23,1 ± 0,3	16,1 ± 0,4	12,1 ± 0,2
Trockengewicht [%]	100	70	52
Anzahl der Reiskörner pro Pflanze	141 ± 4	142 ± 6	116 ± 3
Anzahl der Reiskörner [%]	100	100	82

Tabelle C.3.5: Agrophysiologische Daten des Feldexperimentes zur Eisendüngung. Die Parameter beziehen sich auf einen eisengedüngten Abschnitt und dem Kontrollfeld selbst. Die Daten beruhen auf 4 parallelen Messungen (je Ansatz 4 x 0,25 m²), die im Herbst 1999 durch Mitarbeiter des Reiszüchtungsinstitutes in Vercelli (Oberitalien) bestimmt wurden. Die Abweichungen zeigen die Standardabweichungen von den Mittelwerten.

		Kontrolle	+Eisen
Kornertrag	[t ha ⁻¹]	9,1 ± 0,5	10,0 ± 0,80
Strohertrag	[t ha ⁻¹]	9,9 ± 0,2	10,3 ± 1,8
Pflanzenhöhe	[cm]	*112,5 ± 0,7	*116,9 ± 1,6
Ährenlänge	[cm]	19,3 ± 0,4	19,4 ± 0,2
Korn-Eiweis-Gehalt	[%]	10,3 ± 0,4	10,2 ± 0,3
Pflanzendichte	Halme ⁺ m ²	94,3 ± 16,1	100,3 ± 11,8
Wassergehalt der Pflanzen während der Ernte	[%]	25,6 ± 1,3	23,6 ± 1,7
Ernte Index[#]		0,501 ± 0,005	0,497 ± 0,05

Signifikante Unterschiede (ANOVA) wurden mit Sternchen markiert (* = Signifikant unterschiedlich bei 1% Irrtumswahrscheinlichkeit). ⁺ährentragende Halme; [#]Korngewicht/Biomasse; die Keimungsfähigkeit der Reiskörner aus dem eisengedüngten Bereich war 97% und im Kontrollbereich 88%.

Die Spurenelementanalyse des getrockneten Pflanzenmaterials und die Analyse der Daten auf Signifikanz zeigte, daß lediglich die Mangankonzentrationen unter den beiden Ansätzen im Feldexperiment signifikant unterschiedlich war (Tab. C.3.6).

Tabelle C.3.6: Spurenelementkonzentrationen von getrockneten Blättern und Körnern von Reispflanzen aus dem Feldexperiment zur Eisendüngung. Die Proben stammen aus jeweils 4 x 0,25 m² Abschnitten eines eisengedüngten (2 x 2 m) und eines Kontrollbereiches (10 x 15 m). Die Daten repräsentieren Mittelwerte von $n = 4 \pm \text{SD}$. Die Kornernte erfolgte im Herbst 1999 durch Mitarbeiter des Reiszüchtungsinstitutes. Die Analyse erfolgte mittels Atom-Absorptions-Spektroskopie nach Veraschung des Probenmaterials und anschließendem Aufschluß in konz. HCl durch die Firma Wartig-Chemie GmbH, Sterzhausen, Deutschland.

		Eisen [mg kg ⁻¹]	Magnesium [mg kg ⁻¹]	Kupfer [mg kg ⁻¹]	Mangan [mg kg ⁻¹]
Blätter	Kontrolle	19.0 ± 1.6	892 ± 19	2.1 ± 0.5	40.5 ± 1.5
	+ Eisen	18.3 ± 1.1	866 ± 67	2.2 ± 0.5	59.0 ± 4.7
Körner	Kontrolle	197 ± 2.1	563 ± 42	2.0 ± 0.4	390 ± 61.6*
	+ Eisen	146 ± 18.0	643 ± 58	3.4 ± 1.2	593 ± 91.8*

Signifikante Unterschiede (ANOVA) wurden mit Sternchen markiert (* = Signifikant unterschiedlich bei 1% Irrtumswahrscheinlichkeit).

Das Pflanzenwachstum im Mikrokosmenexperiment zeigte, daß innerhalb der ersten Wochen die Reispflanzen in dem Ansatz mit Ferrihydrat deutlich schwächer wuchsen (Bild C.3.1A). Erst nach der Düngung mit Ammoniumphosphat konnte ein verstärktes Wachstum beobachtet werden, so daß die Pflanzenhöhe nach 143 Tagen ähnlich der der Kontrolle war (Bild C.3.1B). Zusätzlich wurde beobachtet, daß das Einsetzen der Blüte in den Ansätzen mit Ferrihydrat ca. zwei Wochen vor dem der Kontrolle stattfand. Im Feldexperiment wurde jedoch kein Unterschied beim Beginn der Blütezeit beobachtet, und auch das Pflanzenwachstum war in den beiden Ansätzen nicht sichtbar verändert (Bild C.3.2, A-C). Im Ansatz mit Ferrihydrat war das Wachstum anderer Pflanzen „Unkräuter“ im Vergleich zum Kontrollansatz genauso unterdrückt wie im Feldexperiment.

Bild C.3.1: 9 Wochen (A) und 18 Wochen (B) alte Reispflanzen der Mikrokosmosexperimente im Gewächshaus. Von Links nach Rechts abnehmende Eisenkonzentrationen: 30 g, 15 g und ohne Zusatz von Ferrihydrit.

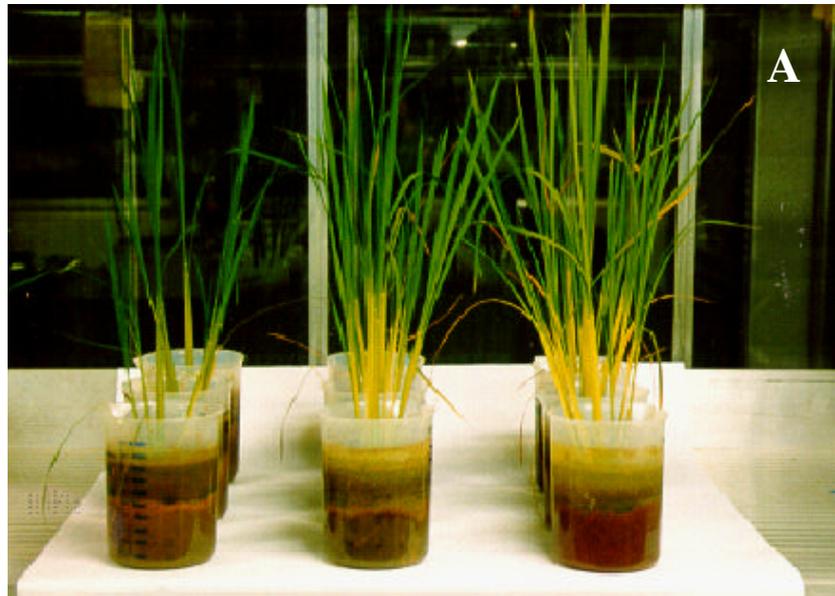


Bild C.3.2: Reispflanzen am 25.06. (A), 17.07. (B) und 02.10.1999 (C). Der Bereich mit erhöhter Eisenkonzentration ist in (A) von Holzplanken umringt und in (B) sowie (C) rot markiert. Die anderen Pflanzen entsprechen der Kontrolle.



C.4 Diskussion

C.4.1 Methanemission und Eisenreduktion

Die Zugabe von Ferrihydrit zu Reismikrokosmen zeigte eine deutliche Verminderung der Methanemission (Abb. C.3.1, Tab. C.3.1). Gleichzeitig waren die Eisen(II)konzentrationen im Boden der Mikrokosmosexperimente am Ende des Versuches mit Ferrihydrit ca. 2fach höher als in der Kontrolle ohne Ferrihydrit (Abb. C.3.3B). Neben der aus früheren Studien schon bekannten Verminderung der Methanemission (Koyama und Kimura, 1998; Watanabe und Kimura, 1999) aus Reismikrokosmosexperimenten durch die Zugabe von Ferrihydrit zeigte dies den direkt gesteigerten und veränderten Elektronenfluß zum Eisen(III) als terminalen Elektronenakzeptor des anaeroben Abbaus. In anoxischen Bodenaufschlammungs-experimenten, denen Ferrihydrit zugesetzt wurde, war die Eisen(II)konzentration am Ende des Versuches ebenfalls mehr als doppelt so hoch wie in der vergleichbaren Kontrolle ohne Ferrihydrit (Jäckel und Schnell, 2000). Die Elektronenbilanzierung in dieser Arbeit zeigte, daß der Anteil der dissimilatorischen Eisenreduktion am anaeroben Abbau von organischem Material von 24% auf 87% durch den Ferrihydritzusatz erhöht wurde. Eine verlängerte Lag-Phase der Methanbildung im durchwurzelten Reisfeldboden, verglichen mit nicht durchwurzeltem Boden, wurde ebenfalls mit einem veränderten Elektronenfluß erklärt (Frenzel et al., 1999) und auf die gesteigerte Akkumulation von Eisenoxiden im wurzelumgebenden Boden zurückgeführt.

Der Zusatz von Ferrihydrit im Feldexperiment führte ebenfalls zu einer ca. 50%ige verringerten Methanemission (Abb. C.3.2). Hiermit konnte zum ersten Mal die Anwendbarkeit dieser Methode, die Methanemission aus dem gefluteten Reisfeld zu vermindern, auch im größeren Maßstab gezeigt werden. Dies sollte ein Anstoß für weitere Untersuchungen in diese Richtung sein.

Der Grund für die Methanemissionsverminderung ist die Substratkompetition zwischen eisenreduzierenden Bakterien mit den Methanogenen. In anoxischen Reisfeldboden-aufschlammungen (Achnich et al., 1995a,b) führte der Ferrihydritzusatz zur Erniedrigung des Wasserstoffpartialdruckes während der Eisenreduktion. Die Methanproduktion war hierdurch thermodynamisch unmöglich. Für Acetat ein weiteres methanogenes Substrat kann dies auch angenommen werden. So waren die Acetatkonzentrationen in Bodenaufschlammungen mit Ferrihydrit während der Eisenreduktion niedrig, während sie in den Ansätzen ohne Ferrihydrit zu dem gleichen Zeitpunkt deutlich anstiegen als eine Methanbildung detektiert wurde (Jäckel und Schnell, in Vorbereitung). Auch im durchwurzelten

Reisfeldboden wurden niedrigere Acetatkonzentrationen detektiert (Frenzel et al. 1999), dies wurde ebenfalls auf erhöhte Eisenreduktion zurückgeführt.

Das Substratspektrum der eisenreduzierenden Bakterien reicht von Wasserstoff, kurz- und langkettigen Fettsäuren bis zu aromatischen Verbindungen. Daraus kann man auch eine Konkurrenz zwischen Eisenreduzierern und syntroph gärenden Organismen und primären Gärern annehmen. Hinweise für eine Substratkonkurrenz deuten auch Experimente mit Bodenaufschlammungen an. Dort war die Propionatkonzentration in anoxischen Bodenaufschlammungen mit Ferrihydrit niedrig, während sie in den Ansätzen ohne Ferrihydrit deutlich angestiegen waren (Jäckel, 1997). Eine solche Konkurrenz kann Einfluß auf die Methanbildung im Boden nehmen, da in anoxischen Reisfeldbodenaufschlammungen ein großer Anteil des Methans syntroph über Propionat als Intermediat gebildet wird (Krylova et al., 1997). Ein eisenreduzierendes Bakterium, welches unter anderem Propionat oxidieren kann ist *Geobacter metallireducens* (Lovley et al., 1993).

Unter bestimmten Bedingungen wurde eine sequentielle Reduktion von Nitrat, Eisen(III), Sulfat und CO₂ im Reisfeld beobachtet (Achnich et al., 1995b; van Bodegom und Stams, 1999, Jäckel, 1997). Die aufgeführten Reihenfolge der einzelnen Redoxprozesse wird durch die thermodynamische Theorie erklärt (Ponnamperuma, 1972; Zehnder und Stumm, 1988).

Diese sequentielle Reduktion erklärt, wieso die Methanbildung in den Ansätzen mit Ferrihydrit erst später einsetzte (Abb. C.3.1), da die Eisenreduktionsphase deutlich verlängert ist (Jäckel, 1997).

Die Methanemissionen aus den Mikrokosmen mit Ferrihydrit wurden im Verlaufe der Vegetationszeit denen der Kontrolle immer ähnlicher (Abb. C.3.1), erreichten jedoch nie die gleiche Rate. Dies kann man darauf zurückzuführen, daß sich in den Mikrokosmen im Gegensatz zu Bodenaufschlammungsexperimenten definierte Eisenreduktionszonen entwickeln (Ratering und Schnell, 2000). Zu Beginn der Flutung war Fe(III) im gesamten Boden vorhanden und die Eisenreduktion der dominierende Prozeß. Nach vollständiger Reduktion des Eisens(III) war eine Eisenreduktion jedoch nur noch dort möglich, wo Eisen(III) regeneriert werden kann. Eine Regeneration von Eisen(III) ist in anoxisch-oxischen Übergangsbereichen im Boden durch chemische und biologische Oxidation von Eisen(II) möglich. In diesen Bereichen bleibt die Methanogenese durch Substratkonkurrenz von Eisenreduzierern mit Methanogenen unterdrückt.

Neben den anoxisch-oxischen Übergangsbereichen an der Bodenoberfläche kommt es auch zur Regeneration von Fe(III)oxiden um die Reiszurzel. Sauerstoff gelangt vom Aerenchym über die

Reiswurzeln in den umgebenden Boden (Green und Etherington, 1977; Anndo et al. 1983; Trolldenier, 1988; Begg et al., 1994; Kirk und Bajita, 1995, Barber et al. 1962, Armstrong, 1971; Frenzel et al. 1992). In der Rhizosphäre kann es nun zur Regeneration von SO_4^{2-} , Fe(III) und NO_3^- durch die mikrobielle und chemische Oxidation von S^{2-} , Fe^{2+} und NH_4^+ kommen. Die Ablagerungen von Eisen(III)oxiden auf den Reiswurzeln der Mikrokosmosexperimente zeigten die Reoxidation von reduziertem Eisen(II). Bei dem extrahierten Eisen(III) von der Wurzeloberfläche (Abb. C.3.3A) der Mikrokosmen handelt es sich vermutlich um Ferrihydrit und Lepitokrokit, da nur diese beiden Oxide durch HCl extrahiert werden können. Beide Oxide sind gut mikrobiell reduzierbar. Für die Reduzierbarkeit der Eisenoxide spielt sowohl die Partikelgröße (Weber, 1979) als auch die Oberfläche (Roden und Zachara, 1996) eine Rolle. Das amorphe Ferrihydrit wird mikrobiell am besten reduziert. Die nach der Extraktion mit 0,5 M HCl verbleibende gelbliche Oxidschicht auf der Reiswurzeloberfläche ist vermutlich das mehr kristalline Oxid Goethit. Dieses Oxid ist nicht mit 0,5 M HCl extrahierbar, wurde aber auf der Wurzeloberfläche gefunden (Bacha und Hosser, 1977, Chen et al., 1980). Es spielt jedoch bei der Eisenreduktion im Reisfeldboden vermutlich nur eine geringere Rolle (s.o.).

Im Mikrokosmosexperiment mit 30 g Ferrihydrit pro kg Reisfeldboden waren am Ende des Experiments lediglich noch 75,5% des Eisens detektierbar. Dies kann auf die Bildung von ferromagnetischem Magnetit zurückgeführt werden. Magnetit ist ein Mischoxid aus Fe(III):Fe(II) , welches neben geologischer Entstehung unter bestimmten Bedingungen auch mikrobiell gebildet werden kann. Zum einen wird es als Produkt während der Eisenreduktion gefunden (Lovley et al., 1987b; Ball et al., 1997; Zhang et al., 1997) und kann einen dominanten Anteil der ferromagnetischen Eigenschaft von Seesedimenten ausmachen (Gibbs-Eggar et al., 1999). Andererseits wird Magnetit in Magnetosomen von magnetotaktischen Bakterien gebildet (Frankel et al., 1979). Der Einsatz hoher Ferrihydritmengen führte auch in Experimenten mit Bodenaufschlämmungen mit dem gleichen Boden zur Bildung von Magnetit (Jäckel und Schnell, in Vorbereitung). Magnetit ist durch die hohe Kristallinität schlechter reduzierbar und wäre in der nächsten Vegetationsperiode für die Eisenreduktion nur wenig verfügbar. Biologisch gebildetes Magnetit ist sogar schlechter reduzierbar für Eisenreduzierer als synthetisch hergestelltes, was vermutlich auf die höhere Kristallinität des biologisch gebildeten Magnetits zurückzuführen ist (Dong et al., 2000).

Die Menge des einzusetzenden Ferrihydrits sollte somit gut gewählt werden, da neben einer eventuellen Eisentoxizität bei zu hoher Eisendüngung die Effizienz durch die Magnetitbildung verringert würde. Dadurch würden bei Einsatz von zu großen Ferrihydritmengen unnötige Kosten entstehen, ohne einen positiven Effekt auf die Methanemission zu erhalten.

Ein großer Vorteil der Eisendüngung ist, daß einmal zugesetztes Eisenoxid über viele Vegetationsperioden die Methanemission verringern könnte, da Eisen(III) durch die schnelle Oxidation während der Drainage am Ende der Vegetation regeneriert wird. Eine Kompetition von Eisenreduzierern mit Methanogenen nach der nächsten Flutung ist somit auch in der nächsten Vegetationsperiode möglich. Da bei schneller Oxidation von Eisen(II) durch Sauerstoff hauptsächlich Ferrihydrit gebildet wird (Schwertmann und Taylor 1989), wäre auch die Reduzierbarkeit des Oxides über einen längeren Zeitraum gesichert. Eine Trockenlegung des Feldes über mehrere Jahre könnte jedoch zur Bildung von kristallineren Eisenoxiden führen (Takahashi et al., 1999) und deren Reduktion wäre nach erneuter Flutung im Vergleich zu Ferrihydrit verlangsamt.

C.4.2 Pflanzenwachstum und Eisentoxizität

Im Mikrokosmosexperiment wurde ein vermindertes Pflanzenwachstum nach Eisendüngung beobachtet (Tab. C.3.4). Dieser Effekt wurde auch von Koyama und Kimura beobachtet (1998). Ein Zusammenhang zwischen hohen Eisenkonzentrationen und toxischen Effekten auf Reispflanzen wurde erstmals von Ponnamperna et al. (1955) beschrieben. Vermindertes Pflanzenwachstum konnte im Feldexperiment jedoch nicht beobachtet werden (Tab. C.3.5). Die Eisentoxizität bei Pflanzen ist ein komplexes Phänomen (Wheeler et al, 1985; Snowden und Wheeler, 1995). Primäre und sekundäre Effekte durch hohe Eisen(II) Konzentrationen in der Reirhizosphäre scheinen für die Eisentoxizität verantwortlich zu sein. Primäre können durch hohe Eisen(II)konzentrationen in Pflanzenzellen ausgelöst werden, die zur Bildung von Hydroxylradikalen aus Wasserstoffperoxid über die Haber-Weiss-Fenton Reaktion führen können (Halliwell und Gutteridge, 1984, 1989). Die entstehenden Hydroxylradikale sind in der Lage, fast alle Zellkomponenten zu oxidieren und so starke Zellschädigungen zu verursachen (Asada und Takahashi, 1987). Sekundäre Effekte der Eisentoxizität scheinen im Zusammenhang mit den Eisenpräzipitationen an der Wurzeloberfläche und in den Intrazellularen der Wurzel zu liegen. Die Diffusion von Sauerstoff aus dem Aerenchym führt zur Eisenplaquebildung an der Wurzeloberfläche. Dies ist eine häufig beobachtete Adaption von

Wasserpflanzen (Armstrong, 1967, 1971, 1979, 1991), die eine Existenz an anoxischen Standorten ermöglicht, in dem sie die Aufnahme großer Mengen von reduzierten Verbindungen wie Fe^{2+} herabsetzt.

Die Aufnahme von Magnesium, Mangan und Kalium in die Wasserpflanzen scheint durch die Plaques stark beeinflusst zu sein (Snowden und Wheeler, 1995). Auch die Phosphatversorgung der Pflanzen ist durch die Eisenpräzipitation stark beeinflusst. Mit erhöhter Eisenkonzentration wurde gerade die Phosphatkonzentration in und an den Wurzeln von weniger resistenten Wasserpflanzen vergrößert, während die Phosphatkonzentration im Sproß kontinuierlich abnahm (Snowden und Wheeler, 1995). Dies wurde mit einer Immobilisierung von Phosphat durch Eisen erklärt, die zu einem Phosphatmangel führte. Dieses Ergebnis wird unterstützt durch die Aufhebung der Eisentoxizität durch den Zusatz von Phosphat (Howeler, 1973) und die Beobachtung, daß eine verstärkte Eisentoxizität an Reispflanzen gerade in nährstoffarmen Böden beobachtet wird (Ottow et al., 1983, Benckiser et al., 1984). Eine Nährstoffunterversorgung der Pflanzen in den mit Eisen gedüngten Mikrokosmen könnte die Beobachtung im Mikrokosmosexperiment erklären, da sich das Pflanzenwachstum erst nach dem Zusatz von Phosphat normalisierte (Bild C.3.1 A und B).

Die Zugabe von Ferrihydrit zum Boden verminderte die Sulfat- und Acetatkonzentration im Porenwasser der Reisfeldbodenaufschlammungen (Abb. C.3.4); vermutlich änderte sich damit auch die Phosphatverfügbarkeit. Durch ihre große Oberfläche haben die Eisenoxide eine große Bedeutung als Anionenaustauscher im Boden (Childs, 1992). Die Effektivität der Adsorption hängt von der Oberflächengröße, vom umgebenden pH-Wert (je niedriger der pH-Wert desto größer ist die positive Oberflächenladung) und vom Anion selbst ab (Parfitt und Smart, 1978). Phosphat wird stärker adsorbiert als Sulfat. Die Oberfläche der Eisenoxide hängt von der Bedingung ihrer Synthese ab. Synthetisch hergestelltes Ferrihydrit hat eine Oberfläche von ca. 290 m² pro Gramm (Parfitt und Smart, 1978). Natürlich entstandenes hingegen hat eine Oberfläche zwischen 550 und 600 m² pro Gramm (Schwertmann, 1988). Bei der natürlichen Bildung von Eisenoxiden erfolgen Substitutionen von Eisenatomen mit z.B. Aluminium- und Siliziumatomen, wodurch ein regelmäßiger Kristallaufbau verhindert wird und dies zur Vergrößerung der Oberfläche führt. Die Bindungen von Anionen wie Cl^- , NO_3^- ist elektrostatischer Natur und wird stark von der pH-Wert abhängigen Oberflächenladung beeinflusst. Sulfat- und Phosphationen werden hingegen nicht nur über elektrostatische Anziehungskräfte adsorbiert, sondern vorwiegend durch Ligandenaustausch fest an die Oberfläche gebunden (Parfitt und Smart, 1978; Turner und Kramer, 1991b; Gisi et al., 1997). Die Adsorption

von Phosphat und/oder Sulfat an Goethit (z.T. auch irreversibel) und Ferrihydrit wurde schon in vielen Studien untersucht (Parfitt und Smart, 1978; Aylmore et al., 1967; Turner und Kramer, 1991a; Strauss et al., 1997).

Die Ferrihydritdüngung könnte neben dem direkten Effekt auf die freie Phosphatkonzentration im Boden, die durch die Adsorptionseigenschaften der Eisenoxide zurückgeht, auch einen indirekten Effekt auf den Phosphathaushalt des Bodens haben, indem extrazelluläre Phosphatasen, die einen Einfluß auf die Phosphatmobilisierung haben, beeinflußt werden. Diese Wirkung wurde indirekt gezeigt. Tonminerale hemmen die saure Phosphatase im Boden (Bayan und Eivazi, 1999). Extrahiert man die Eisenoxide aus den Tonmineralen, wurde die Hemmung verstärkt. Bei der alkalischen Phosphatase wurde dagegen die hemmende Wirkung von Tonmineralen durch das Entfernen der Eisenoxide abgeschwächt.

Obwohl die Ferrihydritdüngung eine verstärkte Nährstofflimitierung für die Pflanzen bewirken könnte, war die übliche Düngung im Feld scheinbar ausreichend, um eine ausreichende Nährstoffversorgung zu gewährleisten.

Von 44 getesteten Pflanzen wurde Reis als eher eisentolerant eingestuft (Snowden und Wheeler, 1995). Dies könnte das verminderte Wachstum von anderen Pflanzen („Unkräutern“) im eisengedüngten Abschnitt erklären. Die Nährstoffverfügbarkeit für die Reispflanze wäre durch die verminderte Konkurrenz mit anderen Pflanzen verbessert. Zum anderen könnte der Ferrihydritzusatz zu einer verbesserten Stickstoffversorgung geführt haben. Im Zusammenhang mit der Kationenadsorption in Böden wird angenommen, daß Ammonium (NH_4^+) aus der Bodenlösung in die Zwischenschichten von negativ geladenen Tonmineralen diffundiert. Nach dem Eindringen in das Mineral findet eine Kontraktion in der Art und Weise statt, daß Ammonium von den normalen Austauschreaktionen im Boden ausgeschlossen wird (Nommik, 1965). Dieses immobilisierte bzw. nicht austauschbare Ammonium ist für die Pflanze generell schwerer verfügbar. Arbeiten von Keerthisinghe et al., (1984), Stucki et al. (1984) und Chen et al. (1987) zeigen, daß nach der Flutung der Gehalt an immobilisiertem Ammonium ansteigt. Dieser Anstieg korreliert sowohl mit der Abnahme des Redoxpotentials (Schneiders und Scherer, 1998) als auch mit der steigenden freien Ammoniumkonzentration durch die Mineralisierung von organischem Material (Schneiders und Scherer, 1998; Zhang und Scherer, 1999). Eine Erklärung für diese Zunahme an immobilisiertem Ammonium wird bisher jedoch noch gesucht. Eisenoxide spielen bei der Ammoniumimmobilisierung

scheinbar eine wichtige Rolle. Durch das Entfernen von Eisenoxiden aus Böden wurde eine verstärkte Ammoniumimmobilisierung nach Ammoniumzugabe beobachtet, während der Zusatz von Goethit und Hämatit diese Fixierung herabsetzt (Scherer und Zhang, 1999). Die Adsorption von positiv geladenen Eisenoxiden um die Tonminerale wurde als Grund für die verminderte Fixierung angesehen. Durch die verminderte Ammoniumimmobilisierung wäre die Verfügbarkeit für die Pflanzen erhöht und könnte einer Nährstofflimitierung entgegenwirken.

C.4.3 Schlußbetrachtung

Die Anwendbarkeit von Ferrihydrit zur Verminderung der Methanemission aus kontrolliert geflutetem Reisanbau konnte sowohl in Mikrokosmen als auch direkt im Feld gezeigt werden. Der primäre Effekt der Eisentoxizität auf die Reispflanzen durch Hydroxylradikalbildung spielte vermutlich nur eine untergeordnete Rolle. Sekundäre Effekte durch erhöhte Eisen(II)-konzentrationen, also eine veränderte Nährstoffaufnahme scheint durch eine ausreichende Düngung vernachlässigbar zu sein. Sollte es an anderen Standorten oder bei Verwendung anderer Reissorten dennoch zu diesen Symptomen kommen, scheint es möglich, eisentolerantere Reissorten einzusetzen, da es große Unterschiede der Eisentoleranz unter Reissorten gibt (Fageria und Rabelo, 1987). Die Anfälligkeit gegen hohe Eisen(II)-konzentrationen in Reispflanzen scheint auf einer verminderten Aktivität der Superoxiddismutase und der Peroxidase zu beruhen (Bode et al., 1995), die einer Bildung von Hydroxylradikalen entgegenwirken können (Rabinowitch und Fridovich, 1983). Ebenfalls scheint es möglich zu sein, die Eisenresistenz von Reispflanzen durch Züchtung zu verbessern (Wu et al., 1998), da die für die Resistenz verantwortlichen Allele auf den Chromosomen lokalisiert sind (Wu et al., 1997).

Aufgrund der vorliegenden Untersuchungen scheint eine effektive Verminderung der Methanemission ohne Ernteeinbuße möglich zu sein. Durch die höhere Eisentoxizität der „Unkräuter“ könnte der Einsatz und die Kosten von Herbiziden eventuell herabgesetzt werden. In Kombination mit der Drainage als Vermeidungsstrategie der Methanemission könnte eine noch effektivere Wirkung erzielt werden und durch die Reoxidation während der Drainage der Eisentoxizität zusätzlich entgegen gewirkt werden. Die Eisendüngung könnte jedoch auch in Reisanbaugebieten eingesetzt werden, in denen keine kurzzeitige Drainage aufgrund von mangelnder Wasserversorgung möglich ist.

Um jedoch den Einsatz von Ferrihydrit praktikierbar zu machen, müssten neben den Herstellungsmethoden und –kosten bei der Großproduktion von Ferrihydrit, der noch wichtigere ökologische Langzeiteffekt einer solchen Düngung durchdacht und untersucht werden.

D. Kapitel 2

Lokalisierung der Methanoxidierenden und Ethylenoxidierenden Aktivitäten im Waldboden der Lahnberge

D.1 Thematischer Überblick und Zielsetzung	53
D.2 Material und Methoden.....	58
D.3 Ergebnisse.....	62
D.4 Diskussion.....	79

D.1 Thematischer Überblick und Zielsetzung

D.1.1 Methanotrophe Aktivität im Waldboden

Waldböden zeigen im Gegensatz zu landwirtschaftlich genutzten Böden deutlich höhere Aufnahmekapazitäten für atmosphärisches Methan. Die gefundenen Aufnahmeraten liegen zwischen 0,1 und 7,6 mg m⁻² und d⁻¹ (Tab. D.1.1).

Tabelle D.1.1: Methanaufnahmekapazitäten unterschiedlicher Waldböden

Quelle	Methanaufnahmerate [mg m ⁻² d ⁻¹]
Yavitt et al., 1990b	2 ^a
Yavitt et al., 1990b	1 ^b
Crill, 1991	4,8
King und Schnell, 1994	≈ 1,1
Dobbie und Smith, 1996	2,19 - 2,97
Priemé und Christensen, 1997	0,65 - 1,38
Butterbach-Bahl et al., 1998	0,12 - 1,34 ^c
Ishizuka et al., 2000	7,6

^aMischwald, ^bFichtenwald, ^cMaximum und Minimum von zwei unterschiedlichen Fichtenwäldern

Maximale Methanaufnahmeraten wurden in Waldböden in 4 - 10 cm Tiefe detektiert (Born et al., 1990; Crill, 1991; Adamsen und King, 1993; Koschorreck und Conrad, 1993; Schnell und King, 1994; Roslev et al., 1997; Primé und Christensen, 1997). Dies ist bemerkenswert, weil in vielen Fällen die maximale Methankonzentration die der Atmosphäre entspricht, direkt an der Oberfläche zu finden ist.

Drei wesentliche Punkte wurden in den letzten Jahren für diese Diskrepanz diskutiert.

1. Die höheren Ammoniumkonzentrationen, in den oberen Bodenschichten, könnten zur Konkurrenz von Ammonium mit Methan an der Methanmonooxygenase führen (Schnell und King, 1994; Primé und Christensen, 1997), da Ammonium durch die Methanmonooxygenase cometabolisch umgesetzt wird und dies zur Substratkonkurrenz führt. Die bei der Oxidation von Ammonium auftretenden Zwischen- und Endprodukte können ebenfalls für die verminderte methanotrophe Aktivität an der Bodenoberfläche verantwortlich sein (Schnell und King, 1994).
2. Das stark schwankende Wasserpotential in der oberen Bodenschicht könnte auch ein Grund für die Lokalisierung der methanotrophen Aktivität in tieferen Zonen sein (Schnell und King, 1996), da sich methanotrophe Bakterien als sehr sensitiv gegenüber Wasserstress erwiesen.
3. Die Methanoxidation in der aktiven Waldbodenschicht wurde durch Bodenextrakte der oberen Bodenschicht bis zu 100% gehemmt (Amaral und Knowles, 1997a). Dies zeigt, daß im Oberboden vorhandene Substanzen für die Hemmung innerhalb dieser Bereiche verantwortlich sein müssen. Als verantwortliche Substanzen wurden Monoterpene diskutiert, die sowohl eine Hemmung der Methanaufnahme im Waldboden (Amaral und Knowles, 1998) als auch bei methanotrophen Bakterien zeigten (Amaral und Knowles, 1998; Amaral et al., 1998a).

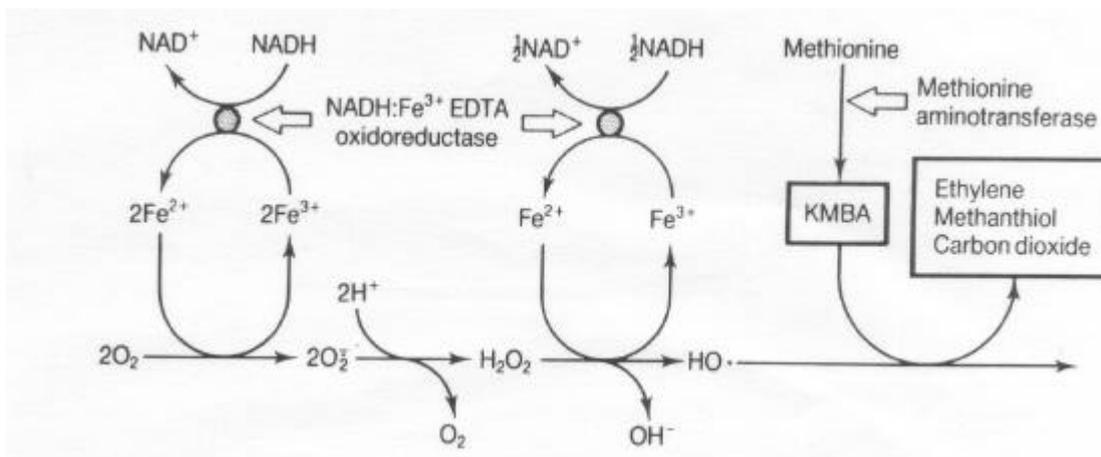
D.1.2 Ethylen

Ethylen ist ein gasförmiges Pflanzenhormon mit einer wichtigen regulatorischen Funktion bei vielen physiologischen Prozessen in Pflanzen (Abeles et al., 1992). Es kann sowohl von Pflanzen als auch von Mikroorganismen (Bakterien, Pilzen und Hefen) gebildet werden, und gerade im Boden gebildetes Ethylen scheint für das Pflanzenwachstum von Bedeutung zu sein (Frankenberger und Arshad, 1995). Neben dem Effekt auf das Pflanzenwachstum wurde jedoch auch ein deutlicher Effekt auf das Pilzwachstum im Boden gezeigt (Smith, 1973). Durch das kontinuierliche Spülen des Bodens mit ethylenfreier Luft kam es zur Mycelentwicklung unterschiedlicher Pilze. Diese Entwicklung konnte jedoch in Ansätzen, denen Ethylen zur Spülluft gegeben wurde, nicht beobachtet werden und Ethylen wurde somit als fungistatisch postuliert (Smith 1973).

Neben der Ethylenbildung durch Pflanzen hat man zwei Wege der Ethylensynthese bei Mikroorganismen entdeckt (Fukuda et al. 1993).

Ein methioninabhängiger Weg wurde in Zell-freien Extrakten von *Escherichia coli* gefunden (Ince und Knowles, 1986). Dieser Bildungsweg ist vermutlich in den meisten ethylenproduzierenden Mikroorganismen der Weg der Ethylensynthese (Fukuda et al., 1993), da unter 229 ethylenbildenden Bakterienarten 225 Ethylen methioninabhängig bildeten (Nagahama et al., 1992). Hierbei wird Methionin über 2-Keto-4-methylthiobuttersäure zu Ethylen abgebaut. Die NADH:Fe³⁺ EDTA Oxidoreduktase katalysiert hierbei die NADH abhängige Reduktion von Fe³⁺-EDTA zu Fe²⁺-EDTA. Die Oxidation von Fe²⁺-EDTA durch molekularen Sauerstoff führt zur Bildung von Superoxid und dessen Dismutation zu Wasserstoffperoxid. Über die Fenton-Reaktion wird Wasserstoffperoxid durch die Oxidation von Fe²⁺-EDTA zum Hydroxylradikal umgewandelt. Aus der Regeneration von Fe²⁺-EDTA durch die Oxidoreduktase kann der Prozeß erneut starten. Methionin wird über eine Methioninaminotrasferase zu 2-Keto-4-methylthiobuttersäure (KMBA) umgewandelt. Die chemische Reaktion von KMBA mit dem gebildeten Hydroxylradikal führt zur Ethylenbildung.

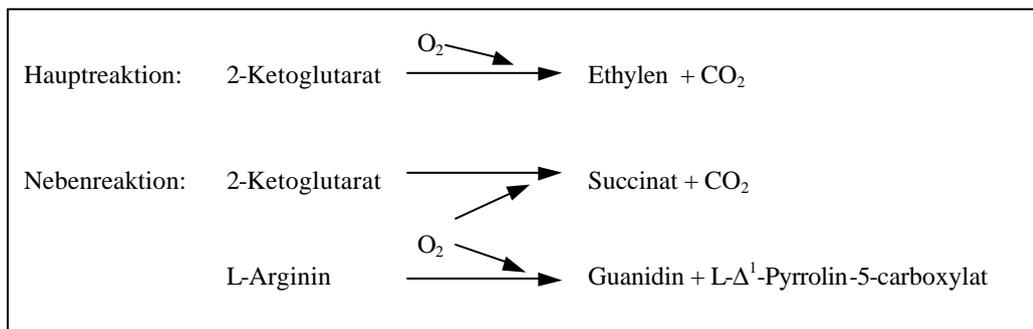
Abbildung D.1.1: KMBA-Weg zur methioninabhängigen Ethylenbildung (aus : Fukuda et al., 1993)



Die Ausgangssubstanz des zweiten Biosyntheseweges ist 2-Ketoglutarat. Dieser Weg (Abb. D.1.2) ist vor allem unter ethylenogenen Pilzen verbreitet. So konnte eine Ethylenproduktion aus 2-

Ketoglutarat bei den Pilzen *Penicillium digitatum*, *Penicillium cyclopium*, *Chaetomium globosum*, *Phycomyces nitens* und *Fusarium oxysporum* nachgewiesen werden (Fukuda et al., 1993). Von allen untersuchten Bakterien waren nur die *P.s. pvs. cannabina*, *glycinea*, *phaseolicola* und *sesami* in der Lage, Ethylen über diesen Biosyntheseweg zu bilden (Sato et al., 1997). Ein einziges Enzym, das ‚ethylene-forming enzyme‘ (EFE), katalysiert die Reaktion. Das EFE gehört zur großen Familie der Fe^{2+} /Ascorbat-Oxidase (Fukuda et al., 1993). Es katalysiert in einer L-Arginin-abhängigen Reaktion die Bildung von Ethylen und Succinat im Verhältnis 2 : 1 (Fukuda et al., 1992). In der Hauptreaktion wird 2-Ketoglutarat dioxygeniert und in 1 Molekül Ethylen und 3 Moleküle CO_2 gespalten. In der Nebenreaktion werden 2-Ketoglutarat und L-Arginin monooxygeniert. Daraus entstehen Succinat und CO_2 bzw. L-Hydroxyarginin, das weiter in Guanidin und L- Δ^1 -Pyrrolin-5-Carboxylat umgewandelt wird.

Abbildung D.1.2: 2-Ketoglutarat-abhängiger Weg der Ethylensynthese



Zur Ethylenoxidation gibt es hingegen bisher nur wenige Untersuchungen. Einige Bakterien der Familien *Mycobacteraceae*, *Norcardiaceae*, die zur Unterordnung der *Corynebacteriaceae* und der Ordnung *Actinomycetales* zählen (Stackebrandt et al., 1997) sind in der Lage, Ethylen vollständig zu oxidieren und hierbei Energie zu gewinnen (van Ginkel et al., 1987). Die Fähigkeit Ethylen cometabolisch zum Epoxyd zu oxidieren wurde z.B. bei *Nitrosomonas europaea*, einem autotroph ammonifizierendem Bakterium gefunden (Hyman und Wood, 1984).

Durch die Unspezifität der Methanmonooxygenase kann Ethylen ebenfalls von Methanotrophen oxidiert werden (Stirling und Dalton, 1979). Das Oxidationsprodukt des Ethylens ist wie bei bei *Nitrosomonas europaea* Epoxyethan (Stirling und Dalton, 1979; Patel et al., 1982; van Ginkel et al., 1987), welches nicht weiter umgesetzt werden kann.

Die Oxidation von im Boden produzierten Ethylen durch methanotrophe Bakterien könnte an Orten wie dem Waldboden (s.o.) eine bedeutende Rolle für ethylenabhängige Prozesse im Boden haben. Hinweise für eine parallele Ethylen- und Methanoxidation im Boden haben Rigler und Zechmeister-Boltenstern (1998,1999) gefunden, die nach unterschiedlichen Bodenbehandlungen ein paralleles Verhalten von Methan- und Ethylenoxidation im Boden beobachteten. Untersuchungen zur Ethylenproduktion sowie zur Methan- und Ethylenoxidation sollten die Rolle der Methanotrophen am Ethylenkreislauf in dem von uns untersuchtem Waldboden klären.

D.2 Material und Methoden

D.2.1 Methanoxidation

D.2.1.1 Flußmessungen aus Waldboden im Winter (Januar 1999)

Um die Methanaufnahmekapazität des Bodens zu bestimmen wurden Bodenkerne mit Plexiglasröhren aus dem Waldboden der Lahnberge (s. Allgemeine Material und Methoden) gestochen. Die Plexiglasröhren (I.D. 6,3 cm) wurden mit grauen Gummistopfen verschlossen. Die Methankonzentration wurde durch zeitlich versetzte Probenahmen und gaschromatographische Analyse von drei unterschiedlichen Bodenkernen verfolgt.

D.2.1.2 Methankonzentrationsprofile

Die Messung erfolgte aus Bodenkernen, die im Januar und Juli 1999 genommen wurden. Zur Profilmessung wurde eine PEEK-Kapillare (i.D.: 0,35 mm, Sykam, Gilching, Deutschland) an einen Metallstab mit Texturband befestigt und in 1 cm Schritten in den Bodenkern gestochen. Die Probenahme erfolgte über eine gasdichte Einwegspritze (1 ml), die mit der Kapillare über einen gasundurchlässigen Schlauch (Iso-Versinic, i.D.: 0,5 mm, Länge 5 cm) und ein Übergangstück verbunden war. Zuerst wurde 0,1 ml Gasprobe gezogen und verworfen, damit die Luft der Kapillare mit der Luft der jeweiligen Tiefe gespült war. Dann erfolgte die Probenahme von 1 ml Gasatmosphäre, die mittels Gaschromatographen analysiert wurde.

D.2.1.3 Potentielle Methanoxidation im Bodenprofil

Um die potentielle Methanoxidation im Waldboden zu lokalisieren, wurden Bodenkerne, die im Januar und Juli 1999 gestochen wurden, in 2 cm Schichten unterteilt. Im Winter wurden 3 Bodenkerne geschnitten, während im Sommer lediglich ein Bodenkern geschnitten wurde. Die Schichten wurden in Müller & Krempel Flaschen (150 ml) übertragen und mit Naturgummistopfen (Latex) verschlossen. Die Veränderung der Methankonzentration mit der Zeit wurde durch Entnahme von 1 ml Gas mit einer Pressure-Lok Spritze (Dynatech Precision sampling Corp., Baton Rouge Louisiana U.S.A.) und der Analyse am Gaschromatographen bestimmt.

D.2.1.4 Ammoniumkonzentration im Profil

Jeweils 5 Gramm frischer Boden jeder Schicht wurde mit 50 ml einer 1M KCl extrahiert (s. 4.7 im Allgemeinen Teil: Material und Methoden) und die Ammoniumkonzentration bestimmt. Die Bestimmung erfolgte in einem Bodenkern, der im Oktober 1999 genommen wurde.

D.2.1.5 Nitrat- und Nitritkonzentration im Profil

Ein Bodenkern, vom Oktober 1999, wurde in 2 cm Schichten geschnitten und auf Sulfat, Nitrat und Nitrit untersucht. Hierfür wurde ein Teil der Bodenschicht (9 - 20 g Fg) mit 20 ml bidestilliertem Wasser verdünnt und 5 min bei Raumtemperatur geschüttelt. Ein Aliquot (1,5 ml) der Bodenaufschlammung wurden in einem Reaktionsgefäß für 5 Min in einer Tischzentrifuge (Hettich, Type 5415C, Firma Eppendorf, Hamburg) zentrifugiert. Der Überstand wurde filtriert (Porenweite 0,2 µm, regenerierte Zellulose, Firma Sartorius, Göttingen) und die Konzentrationen im Filtrat ionenchromatographisch bestimmt.

D.2.2 Ethylen- und Methanproduktionsraten

D.2.2.1 Profilmessung der potentiellen Methan- und Ethylenproduktion

Um die Methan- und Ethylenproduktion im Waldbodenprofil zu messen, wurden Aliquote von Bodenscheiben aus einem Bodenkern (Sommer 1999) (s. 2.1.3), in Müller & Krempel Flaschen übertragen. Die Atmosphäre wurde gegen Stickstoff ausgetauscht und die Methankonzentration über die Zeit durch 1 ml Probenahmen mit einer Pressure-Lok Spritze (Dynatech Precision sampling Corp.)verfolgt.

D.2.2.2 Autoklavierter Boden

Um herauszufinden, ob die Ethylenproduktion auf biologischen Prozessen beruht, wurde Waldboden aus einer Tiefe von 6-10 cm 2 x 30 Minuten bei 121°C autoklaviert und die Ethylenproduktion unter einer Stickstoffatmosphäre in Müller & Krempel Flaschen gemessen. Die Inkubationen wurden bei 25°C im Dunkeln durchgeführt.

D.2.2.3 Einfluß des Wassergehaltes auf die Ethylenproduktion

Ein Bodenkern wurde in 2 cm Schichten unterteilt. Jeweils 3 x 1 g luftgetrockneter Boden aus den Schichten der Tiefen von 2-14 cm wurde in einer Müller & Krempel Flasche mit 0,2 ml, 0,5 ml oder 1 ml demineralisiertem Wasser versetzt. In der Bodenschicht von 0 bis 2 cm Tiefe wurden jeweils nur 0,33 g luftgetrockneter Boden eingesetzt. Anschließend wurde die Atmosphäre in den Flaschen gegen Stickstoff ausgetauscht und die Menge des akkumulierten Ethylens nach einer 28 h Inkubation bei 25°C im Dunkeln gemessen.

D.2.2.4 Effekt von Methionin und Ammoniumchlorid auf die Ethylenproduktion und Methanaufnahme von Waldboden

Zu 10 g feldfrischem Waldboden der Tiefe 6-10 cm wurde 2 ml Methionin- oder Ammoniumchloridlösung (je 8 mM) gegeben. Die Endkonzentration entsprach 1,6 µmol Methionin bzw. Ammoniumchlorid pro Gramm frischem Boden. Die Aufnahme der atmosphärischen Methankonzentration wurde mit Ansätzen verglichen, denen 2 ml demineralisiertes Wasser zugegeben wurden.

Um den Einfluß unterschiedlicher Methioninkonzentrationen zu untersuchen wurden jeweils 2 ml von Methionin-Lösungen der Konzentrationen 8 mM, 1,6 mM, 0,32 mM, 0,064 mM, 0,0128 mM, 2,56 µM dem Boden zugesetzt. Die atmosphärische Methanaufnahme wurden im Vergleich zu Kontrollansätzen mit 2 ml demineralisiertem Wasser untersucht.

D.2.3 Ethylenoxidation

D.2.3.1 Messung der potentiellen Ethylenoxidation im Profil

Zur Bestimmung der potentiellen Ethylenoxidation wurde ein Bodenkern in 2 cm Schichten geschnitten. Zuerst wurde die Methanoxidation (s. 2.1.3) unter atmosphärischen Bedingungen gemessen. Anschließend wurde die Atmosphäre mit Raumluft erneuert und Ethylen bis zu einem Mischungsverhältnis von 40 ppmv zugegeben. Die Ethylenoxidationsrate wurde über die Abnahme der Ethylenkonzentration mit der Zeit bestimmt. Hierfür wurden 1 ml Gasproben entnommen und die Ethylenkonzentration im Gaschromatographen gemessen.

D.2.3.2 Kinetik der Ethylenoxidation

Um die Kinetik der Ethylenoxidation zu bestimmen, wurden jeweils 10 Gramm Boden, der Tiefe 6 - 10 cm, eines Bodenkerns gut gemischt und auf verschiedene Müller & Krempel Flaschen aufgeteilt. Die Flaschen wurden mit Naturgummistopfen verschlossen und Ethylen zur Atmosphäre gegeben. Es wurden Endmischungsverhältnisse von 10 bis 10000 ppmv eingestellt. Die initiale Oxidationsrate wurde bestimmt und gegen die Anfangskonzentration aufgetragen.

D.2.4 Hemmung der Methanoxidation

D.2.4.1 Einfluß von Ethylen und Methanthiol auf die Methanoxidation

Um den Einfluß von Ethylen und Methanthiol auf die Methanoxidation zu bestimmen, wurde Boden aus einer Tiefe von 6 - 10 cm genommen. Jeweils 5 g Boden wurden auf Müller & Krempel (150 ml) aufgeteilt und mit Naturgummistopfen verschlossen. Die Atmosphäre entsprach Raumluft. Mit einer Spritze wurde Ethylen zugegeben um Mischungsverhältnisse von 3 ppmv, 6 ppmv und 10 ppmv und bei Methanthiol von 0,6 ppmv und 14 ppmv zu erreichen. Die Methankonzentration wurde gaschromatographisch verfolgt.

In einem weiteren Experiment wurde der Einfluß von 1,6 ppmv Ethylen bei Wassergehalten von 26%, 51%, 77% und 103% gravimetrischem Wassergehalt untersucht.

D.2.4.2 Reversibilität der Hemmung durch Ethylen und Methanthiol

Die Reversibilität der Hemmung der Methanaufnahme durch Ethylen und Methanthiol wurde bestimmt, indem, wie oben beschrieben, beide Gase bis zu einer Konzentration von 60 ppmv zugesetzt wurden. Hierbei wurde über einen Zeitraum von 2 h die initiale Methanaufnahme der beiden Ansätze und in den Kontrollansätzen ohne Hemmstoff bestimmt. Die Flaschen wurden anschließend geöffnet und für 24 h bei Raumtemperatur offen inkubiert. Der Wasserverlust durch die Verdunstung wurde mit demineralisiertes Wasser ausgeglichen und die Methanaufnahmerate der Ansätze erneut bestimmt. Nach der Messung wurden die Flaschen weitere 24 h offen inkubiert um eine dritte Methanaufnahmerate zu bestimmen.

D.3 Ergebnisse

D.3.1 Methanaufnahme im Waldboden

Um zu überprüfen, ob der Waldboden der Lahnberge atmosphärisches Methan oxidieren kann, wurden Experimente mit intakten Bodenkernen durchgeführt. Hierbei wurden Bodenkern mit Plexiglasröhren aus dem Waldboden gestochen und die Atmosphäre des Gasraumes über dem Boden auf Methanabnahme analysiert.

Die Methankonzentration nahm nach einer Kinetik erster Ordnung ab (Abb. D.3.1). Die initiale Konzentration (1,75 ppmv) verringerte sich innerhalb von 160 Minuten auf Werte zwischen 0,1 und 0,3 ppmv. Die Berechnung der initialen Methanabnahmerate ergab einen Wert von $1,00 \pm 0,26$ mg Methan pro m^2 und Tag.

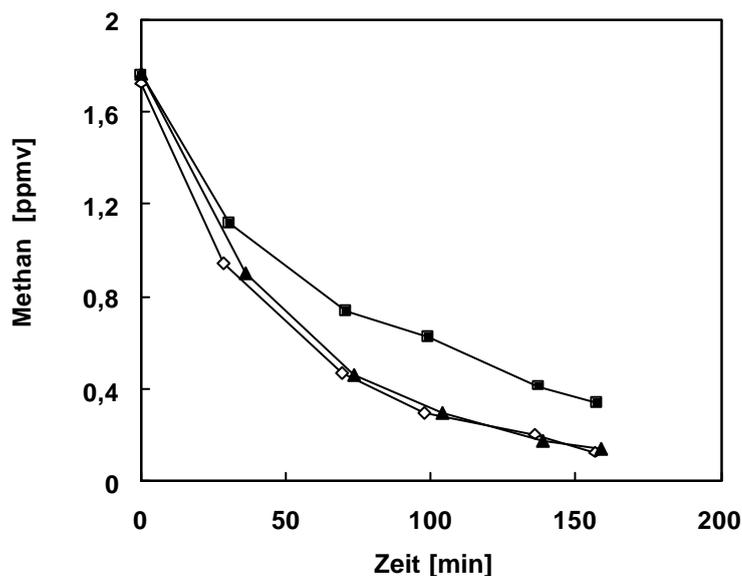


Abb. D.3.1: Zeitlicher Verlauf der Methankonzentration im Gasraum über dem Waldboden. Jede Kurve repräsentiert eine unabhängige Messreihe.

D.3.2 Lokalisierung der Methanaufnahme-Aktivität im Waldboden

Um die Methanaufnahme-Aktivität im Boden zu lokalisieren wurden sowohl Profilmessungen der Methankonzentration durchgeführt als auch die potentiellen Methanaufnahmeraten von

Bodenschichten im Tiefenprofil bestimmt. Sommer und Wintermessungen sollten Aufschluß über jahreszeitliche Schwankung liefern.

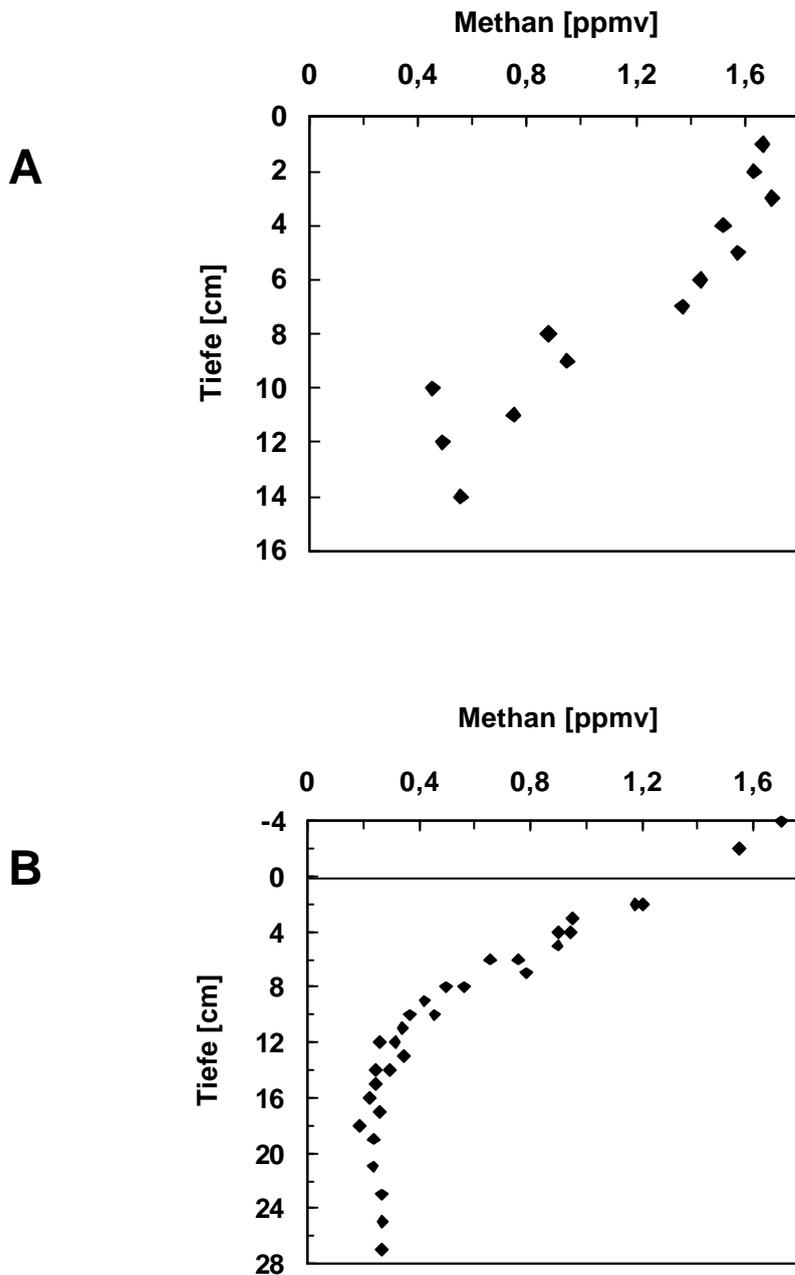


Abb. D.3.2: Methankonzentrationsprofile in Waldbodenkernen die (A) im Winter und (B) im Sommer gestochenen wurden. Jeder Punkt repräsentiert das Methanmischungsverhältnis in der jeweiligen Bodentiefe, die durch einen Meßpunkt bestimmt wurde.

Während die Methankonzentration im Winter innerhalb der ersten 6 cm von ca. 1,7 ppmv auf 1,4 ppmv nur schwach abnahm (Abb. D.3.2A), war das Konzentrationsgefälle im Bereich von 6 bis 12 cm Tiefe mit 0,95 ppmv deutlich stärker.

Im Sommer hingegen nahm Methankonzentration bis zu einer Tiefe von 8 cm linear ab (Abb. D.3.2B) und erreichte einen Wert von ca. 0,4 ppmv. Im Bereich von 8 bis 16 cm Tiefe nahm die Konzentration jedoch nur von 0,4 auf 0,25 ppmv ab.

Der Vergleich der potentiellen Methanaufnahme von Bodenschichten unterschiedlicher Tiefe zeigte (Abb. D.3.3A,B), daß sowohl im Winter als auch im Sommer maximale Werte von ca. 0,8 nmol Methan $\text{g}^{-1} \text{h}^{-1}$ in Bereichen von 10 cm \pm 2 cm Tiefe detektierbar waren. Während im Winter (Abb. D.3.3B) innerhalb der oberen 6 cm keine Methanaufnahme nachgewiesen werden konnte, war sie jedoch in diesen Bereichen im Sommer (Abb. D.3.3A) mit steigenden Werten von 0,3 bis 0,7 nmol Methan $\text{g}^{-1} \text{h}^{-1}$ nachweisbar.

D.3.3 Wassergehalt

Der Wassergehalt spielt bei vielen biologischen und chemischen Prozessen eine bedeutende Rolle, so wird z.B. die Verfügbarkeit einiger Gase in Böden durch ihre geringe Wasserlöslichkeit stark vom Wassergehalt (Diffusionslimitierung) beeinflusst. Um eine Abschätzung des Wassereinflusses auf die untersuchten Prozesse zu bekommen, wurde der Wassergehalt der Waldbodenproben in den Schichten bestimmt, in denen die potentielle Methanaufnahmerate gemessen wurde.

Der gravimetrische Wassergehalt unterschiedlicher Bodenschichten zeigte im Sommer maximale Werte (48%) direkt an der Bodenoberfläche (Abb. D.3.4), während er mit zunehmender Tiefe kontinuierlich abnahm und einen Wert von 5,5% gravimetrischer Wassergehalt in 26 cm Tiefe erreichte. Im Winter waren die maximalen Werte bis zu etwa 7 mal höher als die maximalen Werte im Sommer (Abb. D.3.4). Der gravimetrische Wassergehalt stieg hier mit zunehmender Tiefe auf maximale Werte von 316% im Bereich von 2 bis 6 cm an. Der gravimetrische Wassergehalt unterhalb von 6 cm nahm deutlich ab und erreichte einen Wert von 22% in einer Tiefe von 14-16 cm. Dies entsprach einem ca. 3 mal höheren Wert als in der vergleichbaren Tiefe während der Sommermessung.

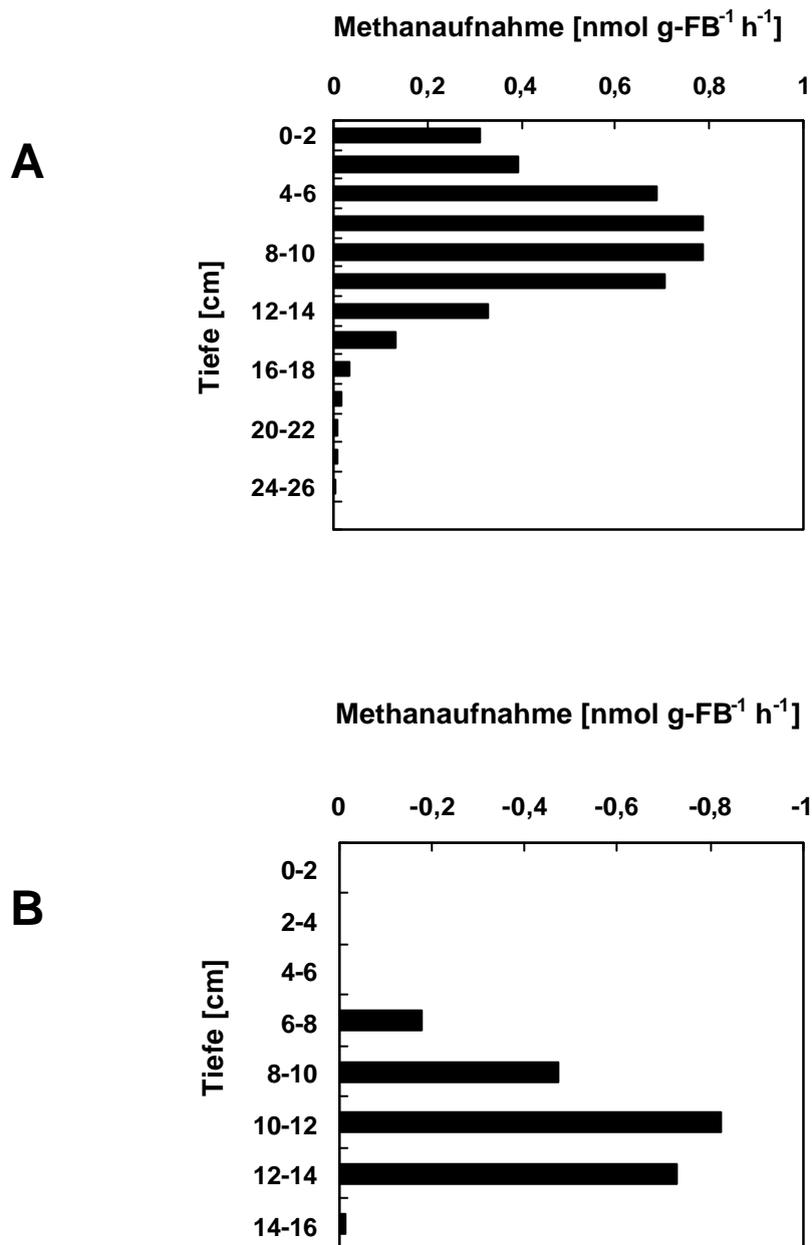


Abb. D.3.3: Atmosphärische Methanaufnahmeraten von Waldboden im Tiefenprofil. Bodenkerne wurden **(A)** im Sommer und **(B)** im Winter gestochen. Die Oxidationsraten der Sommermessung sind Mittelwerte von $n = 3$, die Standardabweichung der Messungen lag zwischen 4 und 22% je nach Bodenschicht. Die Winterraten sind Einzelmessungen der jeweiligen Schichttiefe.

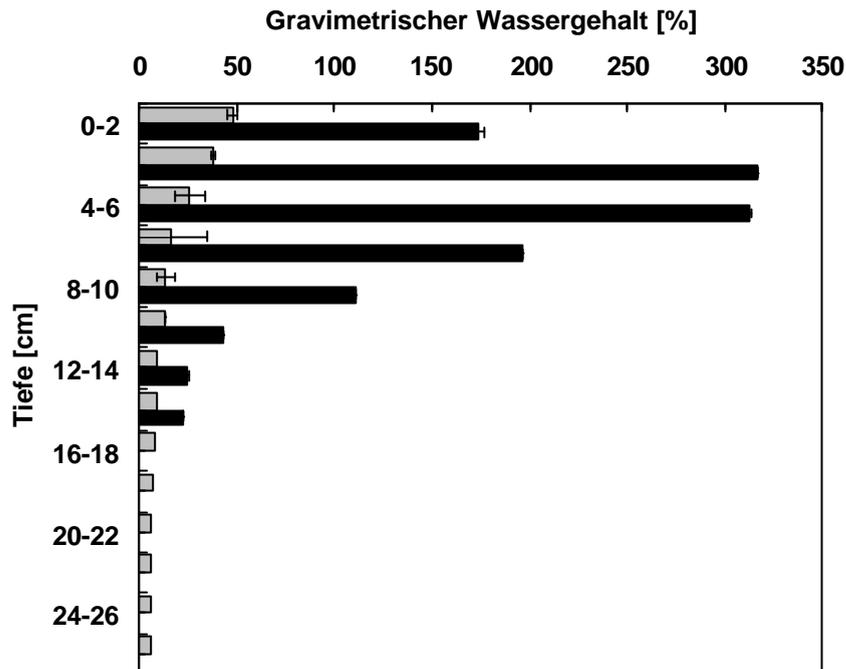


Abb. D.3.4: Wassergehalt der Bodenschichten (jeweils 2 cm Schichtdicke) im Tiefenprofil. Die Waldbodenkerne wurden im Winter (**schwarz**) und im Sommer (**grau**) mit Plexiglasröhren gestochen. Im Winter wurden die Wassergehalte nur bis zu einer Tiefe von 16 cm bestimmt. Die Werte repräsentieren Mittelwerte von $n = 3 \pm SD$.

D.3.4 Kohlenstoff und Stickstoffgehalt im Waldboden

Um den organischen Gehalt in unterschiedlichen Bodentiefen zu bestimmen, wurde eine C-N Elementanalyse der 2 cm dicken Bodenschichten vom Routinelabor des Fachbereiches Chemie der Philipps-Universität durchgeführt. Hierbei zeigten sich deutlich höhere Gehalte an Kohlenstoff, Stickstoff und Wasserstoff in den oberen 6 cm des Bodenkerns verglichen mit den tieferen Bodenschichten (Abb. D.3.5). Hierbei waren die Schichten 0-2 und 2-4 cm sehr ähnlich und zeigten maximale Werte um 43% und 5,8% für Kohlenstoff und Stickstoff.

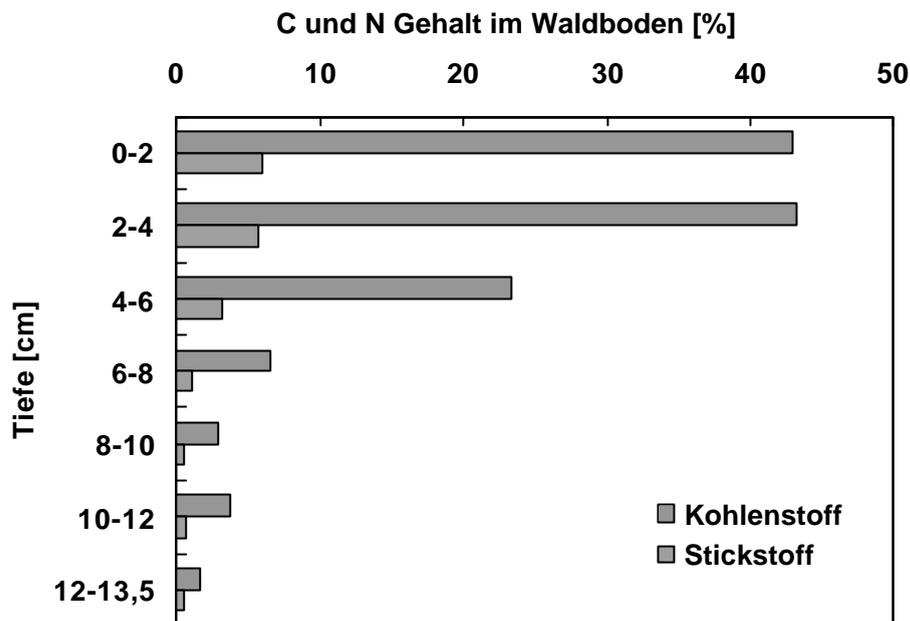


Abb. D.3.5: Kohlenstoff- und Stickstoffanteil von Waldbodenschichten verschiedener Tiefen. Die Werte wurden durch das Routinelabor des Fachbereichs Chemie, der Philipps-Universität-Marburg durch Einzelmessungen bestimmt.

D.3.5 Ammonium- und Nitratkonzentrationen

Ammonium und auch Nitrat war in den Bodenschichten nachweisbar (Abb. D.3.6). Beide zeigten maximale Werte von ca. 16 $\mu\text{g N}$ -Ammonium und 4 $\mu\text{g N}$ -Nitrat pro Gramm frischem Boden direkt an der Oberfläche des Waldbodens. Die Konzentration von N-Ammonium nahm mit der Tiefe kontinuierlich ab und entsprach bei 8 bis 12 cm nur noch einem Viertel der Oberflächenkonzentration. Die Konzentration von N-Nitrat in der Tiefe von 2-4 cm war ca. 25fach geringer als in der Oberflächenschicht (0-2 cm). Mit zunehmender Tiefe nahm die Konzentration weiter ab und blieb ab 8-10 cm mit 6,8 ng N-Nitrat pro Gramm frischem Boden mehr oder weniger konstant. Nitrit war in keiner Bodenschicht nachweisbar.

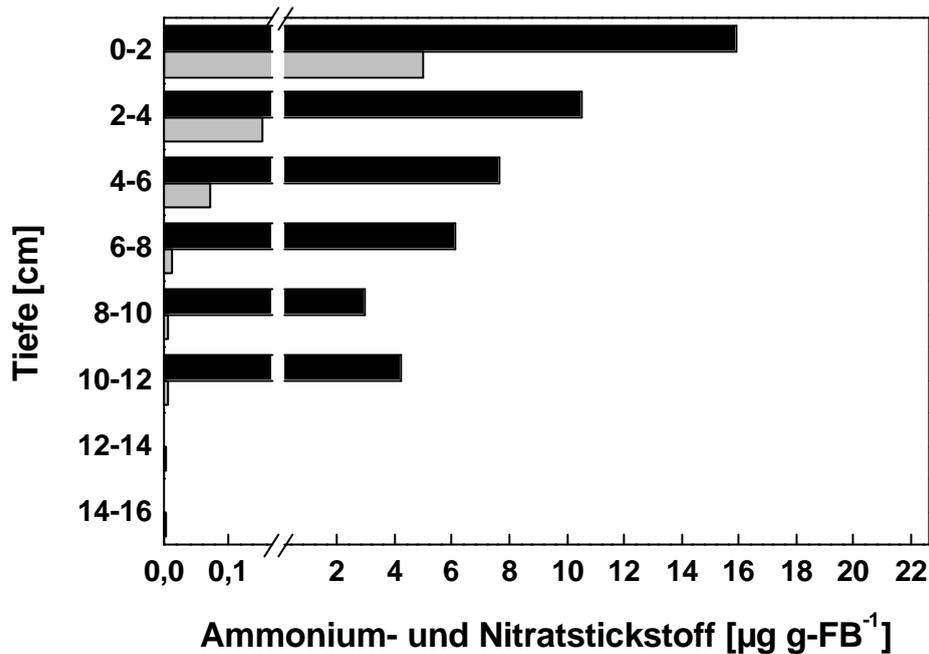


Abb. D.3.6: Konzentrationen von N-Ammonium (**schwarz**) und N-Nitrat (**grau**) in Waldbodenschichten unterschiedlicher Tiefe die N-Ammoniumkonzentration wurde nur bis zu einer Tiefe von 12 cm bestimmt. Es wurden Mittelwerte einer Doppelbestimmung aufgetragen.

D.3.6 Ethylenakkumulation unter anoxischen Bedingungen

Anoxischen Inkubationen zeigten eine Akkumulation von Ethylen, die jedoch mit zunehmender Inkubationszeit schwächer wurde (Abb. D.3.7). Daher wurde in den weiteren Versuchen jeweils die akkumulierte Ethylenmenge zu einem bestimmten Zeitpunkt angegeben und miteinander verglichen. Eine Akkumulation von Methan konnte nicht beobachtet werden.

Die anoxischen Inkubationen von Waldboden unterschiedlicher Tiefe zeigte, daß die akkumulierte Ethylenmenge pro Gramm frischem Boden in tieferen Schichten abnahm und in einer Tiefe von 20-22 cm nicht mehr nachweisbar war (Abb. D.3.8).

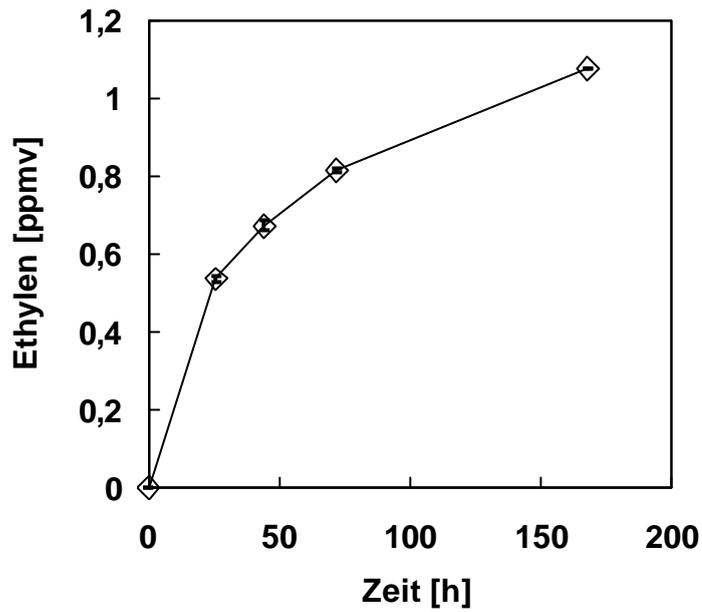


Abb. D.3.7: Zeitlicher Verlauf der Ethylenkonzentration in anoxischen Waldbodeninkubationen der Tiefe 4-6 cm. Die Werte zeigen Mittelwerte von $n = 2$. Die Fehlerbalken entsprechen den maximalen und minimalen Werten.

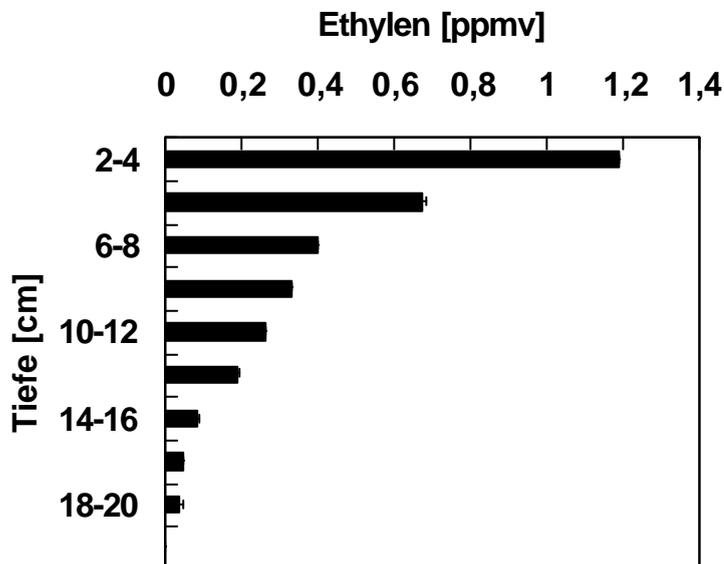


Abb. D.3.8: Ethylenakkumulation von Waldboden (4 gFB^{-1}) im Tiefenprofil nach 44 Stunden Inkubation unter einer Stickstoffatmosphäre. Die Balken repräsentieren Mittelwerte von $n=2$. Die Fehlerbalken zeigen den maximalen und minimalen Wert.

Um herauszufinden, ob die Ethylenproduktion auf biologischen Prozessen beruht, wurde die Ethylenproduktion von frischem und autoklaviertem Waldboden unter anaeroben Bedingungen gemessen. Dies zeigte, daß innerhalb von 21 Stunden etwa 40 mal weniger Ethylen im autoklavierten Waldboden akkumulierten (Abb. D.3.9) als im unbehandelten Waldboden.

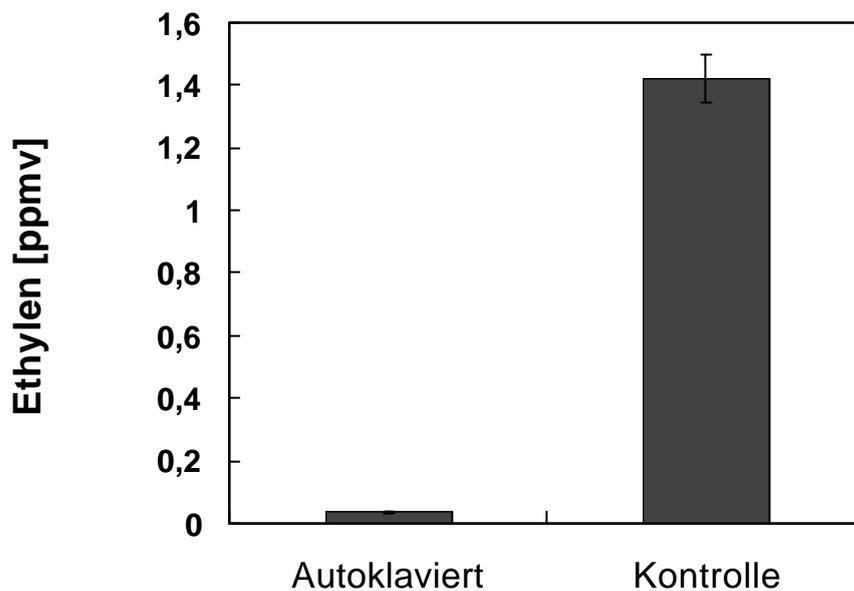


Abb. D.3.9: Vergleich von Ethylenakkumulationen nach 21 Stunden anoxischer Inkubation von autoklaviertem und frischem Waldboden. Die Balken zeigen Mittelwerte von $n = 2$. Die Fehlerbalken entsprechen den maximalen und minimalen Wert.

Die Veränderung des Wassergehaltes der einzelnen Schichten hatte keinen deutlichen Einfluß auf die Ethylenakkumulation (Abb. D.3.10).

Da Ethylen mikrobiell vorwiegend aus Methionin gebildet wird, wurde der Zusatz von Methionin auf die Ethylenbildung untersucht. Dieser zeigte jedoch unter anoxischen Bedingungen keine gesteigerte Ethylenproduktion im Vergleich zur Kontrolle (Abb. D.3.11).

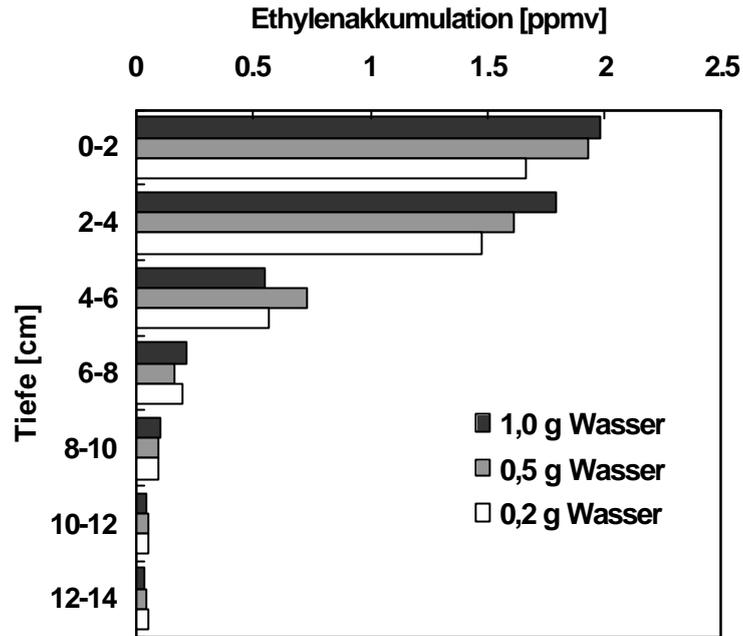


Abb. D.3.10: Akkumulierte Ethylenmenge nach 28 stündiger, anoxischer Inkubation von Waldboden im Tiefenprofil in Abhängigkeit vom Wassergehalt. Mit Ausnahme der 0-2 cm Schicht wurde pro Gramm trockenem Boden entweder 1 g demineralisiertes Wasser (schwarz), 0,5 g demineralisiertes Wasser (grau) und 0,2 g demineralisiertes Wasser (weiß) zugegeben. In Bodeninkubationen der 0-2 cm Schicht wurde die angegebene Wassermenge zu 0,33 g trockenem Boden gegeben. Jeder Balken repräsentiert eine Einzelmessung.

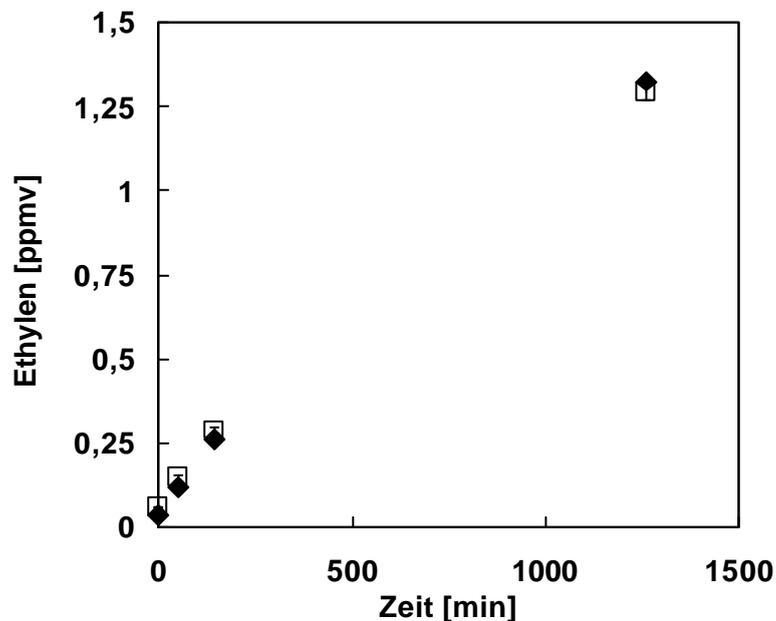


Abb. D.3.11: Verlauf der Ethylenkonzentration in Waldbodeninkubationen der Schicht 5-10 cm mit dem Zusatz von 2 ml demineralisiertem Wasser (□) oder 2 ml Methioninlösung (8 mM) (◇) unter einer Stickstoffatmosphäre. Die Werte entsprechen Mittelwerten von $n=3 \pm SD$.

D.3.7 Hemmung der Methanaufnahmeaktivität durch Methionin

Die atmosphärische Methanaufnahme wurde durch den Zusatz von Methionin fast vollständig unterdrückt (Abb. D.3.12). Um einen Salzeffekt durch Methionin sowie eine Hemmwirkung durch eine mögliche Freisetzung der Ammoniumgruppe vom Methionin auszuschließen wurde in gleicher Konzentration Ammoniumchlorid zu weiteren Proben gegeben. Der Ansatz mit Ammoniumchlorid zeigte jedoch einen sehr geringen Effekt auf die Methanaufnahme im Vergleich zur Kontrolle (Abb. D.3.12).

Um den Einfluß unterschiedlicher Methioninkonzentrationen auf die Methanaufnahmerate zu bestimmen, wurden jeweils 1,6 μmol , 0,32 μmol , 64 nmol, 12,8 nmol, 2,56 nmol und 0,51 nmol μmol Methionin pro Gramm frischem Boden zugesetzt und die atmosphärische Methanaufnahmeaktivität im Vergleich zum Boden ohne Methionin detektiert. Die Aufnahme atmosphärischen Methans nahm deutlich mit steigender Methioninkonzentration ab. Die Aufnahme im Ansatz mit 64 nmol Methionin war um ca. 28% und im Ansatz mit 1,6 μmol sogar um 85% gehemmt (Abb. D.3.13).

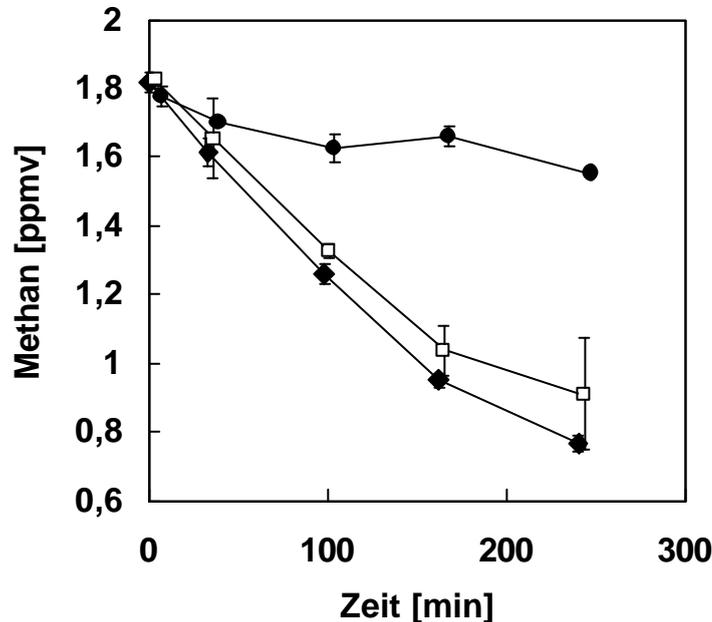


Abb. D.3.12: Zeitlicher Verlauf der atmosphärischen Methankonzentration in Waldbodeninkubation (Schichttiefe 6-10 cm). Dem Boden wurden (♦) 2 ml Wasser (bidest), (□) 2 ml 8 mM Ammoniumchloridlösung und (●) 2 ml 8 mM Methioninlösung zugesetzt. Die Werte entsprechen Mittelwerten von $n = 3 \pm \text{SD}$.

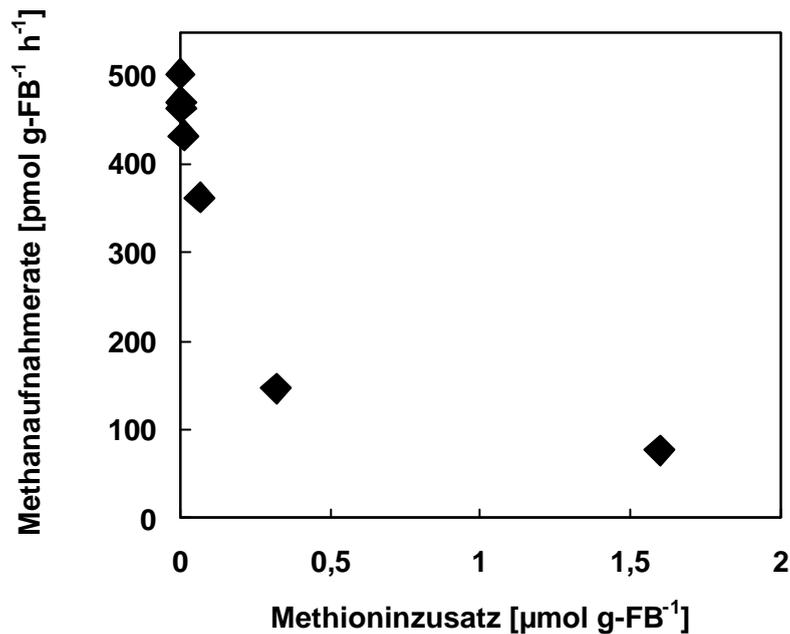


Abb. D.3.13: Einfluß der Methioninkonzentration auf die Aufnahmerate atmosphärischer Methankonzentrationen von Waldboden der Tiefe 5-10 cm. Die Werte entsprechen den Raten aus Einzelansätzen.

D.3.8 Ethylenaufnahmeaktivität

Um die Frage zu klären, ob die methanotrophen Bakterien im untersuchten Waldboden für die Ethylenoxidation verantwortlich sind, wurde sowohl die potentielle Methanaufnahme als auch die Ethylenaufnahme in den unterschiedlichen Bodenschichten gemessen und miteinander verglichen.

Während die Ratenkonstante der Methanaufnahme in der oberen Zone von 0 - 6 cm und in einer Tiefe von 12-14 cm kaum meßbar war, konnte eine deutlich höhere Ratenkonstante im Bereich von 6 - 12 cm Tiefe beobachtet werden (Abb. D.3.14). Der Bereich maximaler Ethylenaufnahme lag in einer Tiefe von 2-8 cm (Abb. 14) und somit oberhalb der Zone der maximalen Methanaufnahme. Diese war jedoch ca. 60 – 100fach geringer als die Ratenkonstante der Methanoxidation. Die Ratenkonstante der Ethylenaufnahme nahm ab einer Tiefe von 8 cm linear ab.

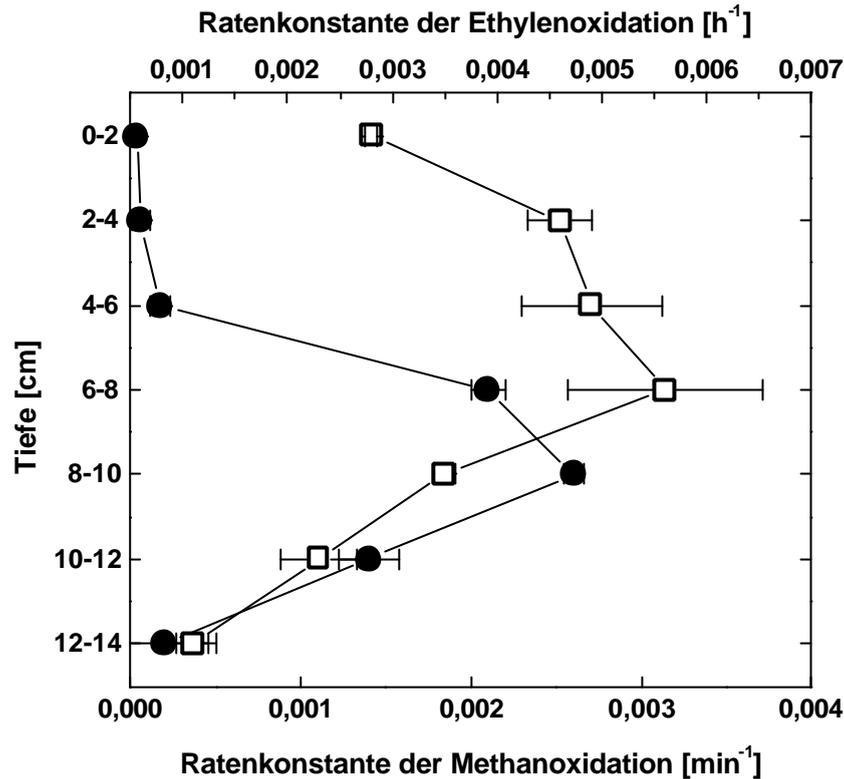


Abb. D.3.14: Ratenkonstanten der Aufnahme von atmosphärischem Methan (●) und Ethylen (40 ppmv Initialkonzentration) (□) in Waldböden unterschiedlicher Schichttiefe (jeweils 2 cm Schichtdicke) zuerst wurde die Methanaufnahme verfolgt. Anschließend wurde der Atmosphäre Ethylen zugesetzt, nachdem die Atmosphäre gegen Raumluft erneuert war. Die Werte entsprechen Mittelwerten von $n = 3 \pm \text{SD}$.

Die Kinetikmessung zur Ethylenaufnahme zeigte ein Abflachen der Kurve im Bereich von 100 nmol pro Gramm frischem Boden und Stunde, die Geschwindigkeit der Ethylenaufnahme stieg dann jedoch wieder an (Abb. D.3.15). Die Auswertung der Daten nach Lineweaver und Burk im Konzentrationsbereich von 10 ppmv bis 200 ppmv ergab $K_{m(\text{app})}$ - und V_{max} -Werte von 23 ppmv bzw. 40 nmol pro Gramm feuchtem Boden und Stunde, im Bereich von 2300 ppmv bis 10000 ppmv waren der $K_{m(\text{app})}$ -Werte 12600 ppmv bzw. der V_{max} -Wert 1000 nmol pro Stunde und Gramm feuchtem Boden.

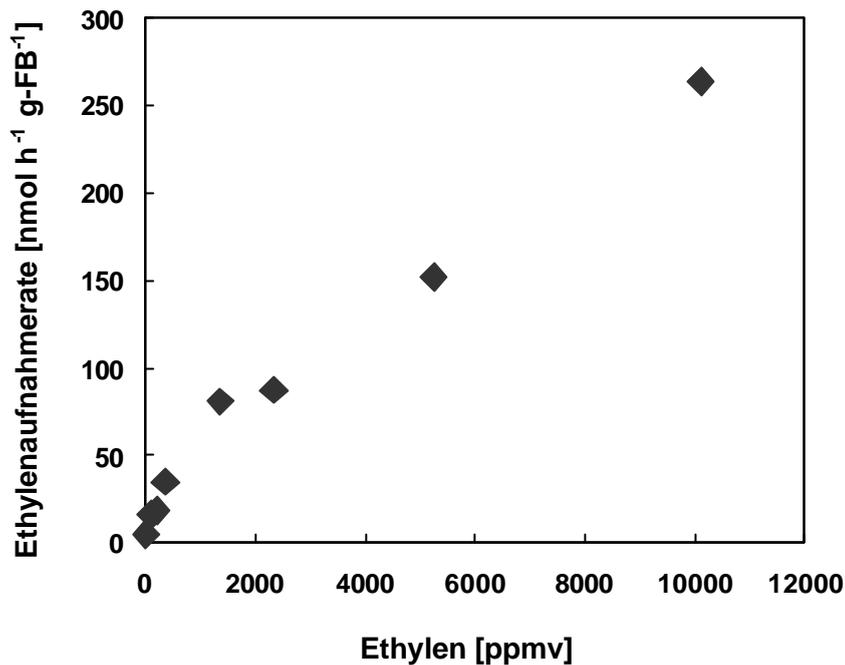


Abb. D.3.15: Initiale Ethylenaufnahmerate ($\text{nmol h}^{-1} \text{g-FB}^{-1}$) von Waldbodeninkubationen in Abhängigkeit von der Ethylenkonzentration (10 – 10000 ppmv) im Gasraum. Jeder Meßpunkt entspricht der Ethylenaufnahme eines unabhängigen Ansatzes mit der entsprechenden Ethylenkonzentration.

D.3.9 Einfluß von Ethylen auf die Methanaufnahme

Der Einfluß von Ethylen auf die Methanaufnahmerate wurde untersucht, indem die Methanaufnahmerate in Abhängigkeit von unterschiedlichen Ethylenkonzentrationen in der Atmosphäre gemessen wurde. Mit steigender Ethylenkonzentration nahm die Methanaufnahmerate deutlich ab. Bei Ethylenkonzentrationen von 3, 6 und 10 ppmv erfolgte eine Verminderung der Methanaufnahmeraten um 21, 63 und 98,5% (Abb. D.3.16).

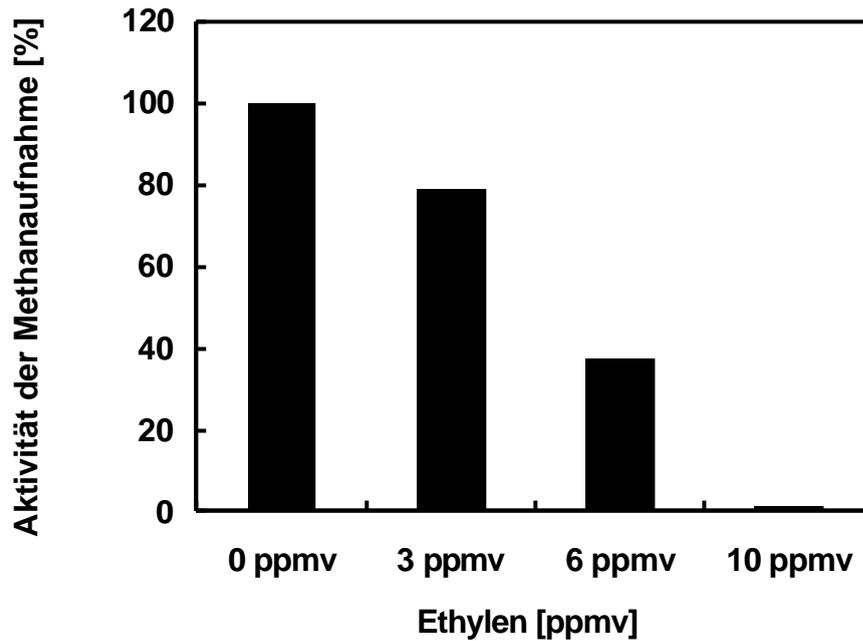


Abb. D.3.16: Vergleich der Methanaufnahmeaktivität von Waldbodeninkubationen unter atmosphärischen Methanmischungsverhältnissen ohne und mit 3, 6, und 10 ppmv Ethylen in der Atmosphäre. Die Balken zeigen den Prozentualen Wert im Vergleich zur Messung ohne Ethylen in der Atmosphäre. Es wurde jeweils die Ratenkonstanten in Einzelansätzen bestimmt.

D.3.10 Einfluß von Methanthiol auf die Methanaufnahme

Da Methanthiol ein zusätzliches Abbauprodukt von Methionin darstellen kann, wurde der Effekt von Methanthiol auf die atmosphärische Methanaufnahme untersucht. Hierbei zeigte sich, daß die Ratenkonstante der Methanaufnahme in Anwesenheit von 0,6 ppmv Methanthiol, um 23,5% gehemmt war und die Hemmung bei 14 ppmv Methanthiol bei 46% lag (Abb. D.3.17).

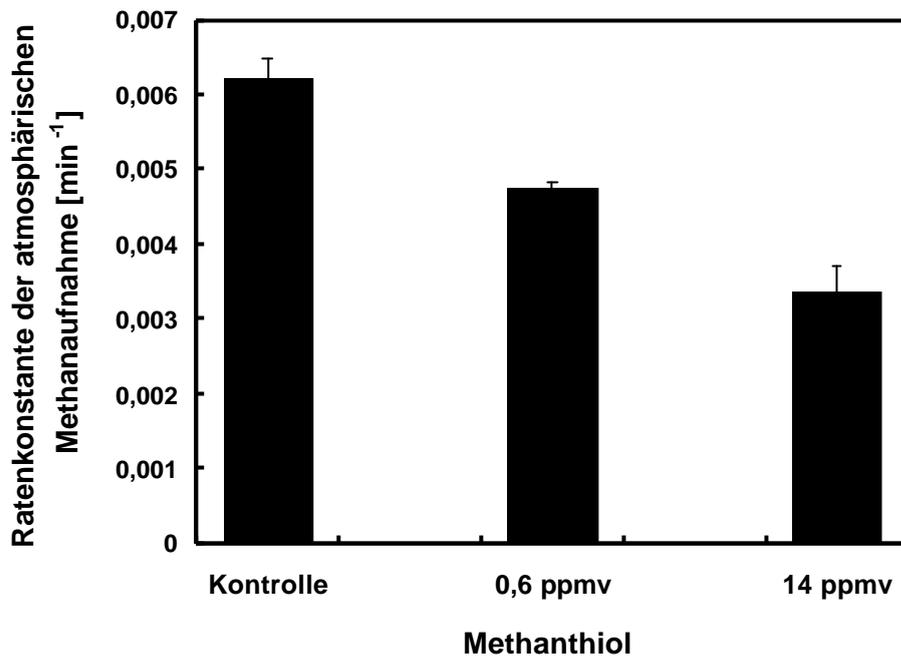


Abb. D.3.17: Vergleich der Ratenkonstante der atmosphärischen Methanoxidation von Waldboden in Anwesenheit verschiedener Methanthiolkonzentrationen. Die Balken zeigen Mittelwerte von $n = 2$. Die Fehlerbalken repräsentieren den maximalen und minimalen Wert.

D.3.11 Reversibilität der Hemmung

Die anhaltende Verminderung der atmosphärischen Methanaufnahme durch einmalige Zugabe von Methanthiol und Ethylen wurden untersucht, indem sowohl der direkte Effekt auf die Methanaufnahmerate bestimmt wurde als auch der Effekt nach unterschiedlichen Zeitpunkten des Ausgasens beider Substanzen.

Sowohl der Ansatz mit Ethylen, als auch der mit Methanthiol zeigte bei direkter Einwirkung der Substanzen eine 86% bzw. 90% verminderte Ratenkonstante der Methanaufnahme verglichen mit der der Kontrolle (Abb. D.3.18A). Die Methanaufnahmerate der Kontrolle zeigte nach 24stündiger Inkubation bei geöffnetem Deckel und Einstellung des initialen Wassergehaltes eine um ca. 8% verringerte Ratenkonstante der Methanaufnahme zum Vortag (Abb. D.3.18A,B).

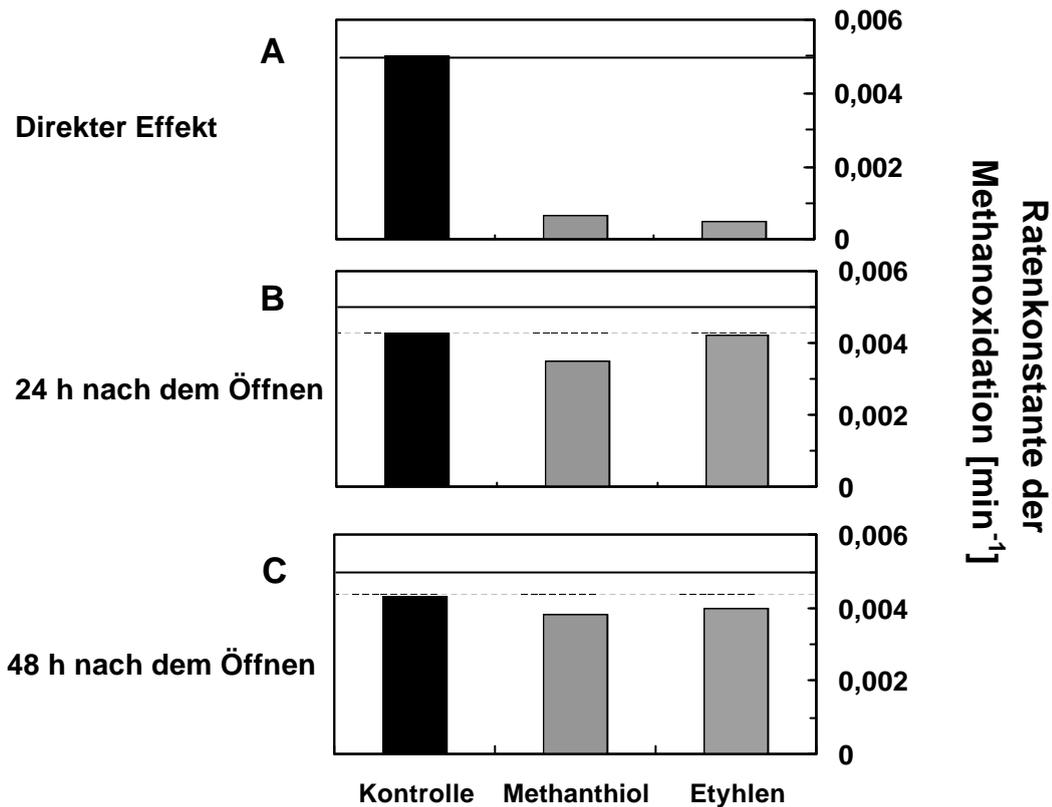


Abb. D.3.18: Einfluß von Methanthiol (**grau**) und Ethylen (**gestreift**) auf die Ratenkonstante der Methanaufnahme im Vergleich zur Kontrolle (**schwarz**). Während (**A**) den direkten Einfluß von 60 ppmv des jeweiligen Gases zeigt, repräsentiert (**B**) und (**C**) die Methanaufnahme nach dem Öffnen und damit dem Entfernen des jeweiligen Gases nach 24 und 48 h. Der Wasserverlust durch das Öffnen wurde durch Zugabe von bidestilliertem Wasser ausgeglichen. Die Inkubation erfolgte bei 25°C im Dunkeln. Die Daten zeigen Mittelwerte von n=2.

Die Methanaufnahme im Ethylenbehandelten Ansatz entsprach 24h nach dem Öffnen, der Methanaufnahme der Kontrolle zu diesem Zeitpunkt (Abb. D.3.18B), während der Ansatz mit Methanthiol eine um 17,5% verringerte Ratenkonstante der Methanaufnahme zeigte (Abb. D.3.18B). Die Ratenkonstanten der Methanaufnahme war 48 Stunden nach dem Öffnen gegenüber denen des Vortages nur gering verändert (Abb. D.3.18C).

D.4 Diskussion

Wie auch andere Waldböden, besitzt der untersuchte die Kapazität atmosphärisches Methan zu oxidieren und zeigt die Bedeutung oxischer Böden als Nettosenke für atmosphärisches Methan. Die Aufnahmerate war im Winter mit $1 \pm 0,26$ mg pro m^2 ähnlich wie in Waldböden, die von Yavitt et al., (1990b), King und Schnell (1994), Priemé und Christensen (1997) und Butterbach-Bahl et al. (1998) untersucht wurden. Man kann jedoch annehmen, daß die Aufnahmerate in den wärmeren Jahreszeiten größer ist. Dies wird durch die Lokalisierung der methanotrophen Aktivität gezeigt, die im Winter nur in 6 bis 14 cm Tiefe deutlich detektiert werden konnte (Abb. D.3.3B), während sie im Sommer in allen Tiefen vorhanden war (Abb. D.3.3A). Darüber hinaus wurde auch durch eine Gesamt-DNA-Extraktion gezeigt, daß im Sommer viel höhere DNA-Konzentrationen im Boden vorhanden waren als im Winter (Henckel et al., 2000); dies könnte, muß jedoch nicht zwingend in Korrelation mit der mikrobiellen Aktivität sein.

Maximale Ammoniumkonzentrationen an der Oberfläche und abnehmende Ammoniumkonzentrationen mit zunehmender Tiefe (Abb. D.3.6) deuten ähnlich wie bei der Methanoxidation auf eine Lokalisierung der Ammoniumoxidation (Nitrifikation) in tiefere Schichten hin oder auf eine stärkere Freisetzung von Ammonium in der obersten Schicht. Die erste Hypothese der Lokalisierung der Ammoniumoxidation in tiefere Bodenschichten wird unterstützt durch den Nachweis von *amoA*-Sequenzen (Henckel et al., 2000) in den tieferen Schichten, sowohl im Sommer als auch im Winter. Die *amoA* kodiert für die Ammoniummonooxygenase (*amoA*). Das von Henckel et al., 2000 verwendete Primersystem besitzt eine hohe Zielspezifität für die α -Untereinheit der partikulären Methanmonooxygenase (*pmoA*) (Holmes et al., 1995), kann aber auch den homologen Genabschnitt der Ammoniummonooxygenase erfassen. Purkhold et al., 2000 zeigten jedoch, daß dieses Primersystem nicht unbedingt alle Sequenzen der Ammoniummonooxygenase erfasst. Weiterhin wurde innerhalb der oberen 10 cm keine N_2O Produktion detektiert (Avrahami, persönliche Mitteilung), was auf ein Fehlen von Nitrifikation in dieser Tiefe schließen könnte, da N_2O als Nebenprodukt bei der Nitrifikation auftreten kann. Nitrit als Zwischenprodukt der Nitrifikation wurde ebenfalls nicht detektiert. Die Lokalisierung der nitrifizierenden Aktivität in tieferen Bodenschichten des Waldbodens würde mit Beobachtungen von Amaral und Knowles (1997b) übereinstimmen. Gegen diese Vermutung spricht jedoch, daß Nitrat die höchste Konzentration an der

Bodenoberfläche zeigte und diese mit zunehmender Tiefe abnahm (Abb. D.3.6). Dies könnte für eine maximale Nitrifikation an der Bodenoberfläche sprechen und wäre in Übereinstimmung mit Beobachtungen von Schnell und King (1994), die die Lokalisierung der maximalen Nitrifikation an der Bodenoberfläche zeigten und diese Beobachtung mit den dort gefundenen höheren Ammoniumkonzentrationen korrelierte. Für den hier untersuchten Boden würde dies bedeuten, daß die Nitrifizierer im oberen Bodenbereich mit dem verwendeten Primersystem nicht detektierbar sind (s.o.). Untersuchung mit spezifischen Primern für die *amoA* könnte hierbei weitere Erkenntnisse liefern. Neben einer Nitrifikation durch autotrophe Bakterien könnte die höher Nitratkonzentration an der Bodenoberfläche auch durch heterotrophe Ammoniumoxidation verursacht worden sein. Der Eintrag von Nitrat und auch von Ammonium über den Regen wäre auch denkbar. Die Nitratkonzentrationen im Regenwasser ist durch Autoabgase zwischen 1900 und 1980 z.B. in Hubbard Brook in den Vereinigten Staaten ca. 4fach gestiegen und lag 1980 bei etwa 1,4 mg/l (Graedel und Crutzen, 1994). Die mit zunehmender Tiefe abnehmende Nitratkonzentration könnte hierbei auf Auswaschvorgänge zurückgeführt werden.

Die Detektion der potentiellen Ethylenoxidation im Vergleich zu der Methanoxidation im Tiefenprofil zeigen die unterschiedliche Lokalisierungen der beiden Prozesse. Im Oberboden, in dem auch die höchste Ethylenproduktion vorhanden ist (s.u.), ist auch die maximale Ethylenoxidation detektierbar. Die maximale Methanoxidation war hingegen unterhalb dieser Bereiche zu finden. Daraus läßt sich schlußfolgern, daß im oberen Boden andere Organismen als Methanotrophe das zugesetzte Ethylen oxidieren (Abb. D.3.14). Kinetikmessungen zur Ethylenoxidation von Bereichen, in denen sowohl Methanoxidation als auch Ethylenoxidation detektiert werden konnte, zeigten einen zweiphasischen Verlauf (Abb. D.3.15). Dies läßt darauf schließen, daß mindestens zwei unterschiedliche Organismengruppen an der Ethylenoxidation beteiligt sein müssen. Im unteren Konzentrationsbereich wurde ein $K_{m(app)}$ Wert von 23 ppmv detektiert. Dieser Wert liegt im selben Bereich (20 - 70 ppmv) wie Werte in anderen Böden (De Bont, 1976). Ein Mycobakterium (Stamm E20), das innerhalb dieser Studie mit Ethylen als Kohlenstoff und Energiequelle isoliert wurde, zeigte einen ähnlichen $K_{m(app)}$ -Wert und war vermutlich für die Ethylenoxidation in diesem Boden verantwortlich. Mycobakterien scheinen in Waldböden häufig vorhanden zu sein, da z.B. in allen 47 untersuchten Koniferenwäldern hohen Zahlen an Mycobakterien im organischen Bodenhorizont gefunden wurden (Iivanainen et al., 1997). Dies könnte darauf hindeuten, daß im untersuchten Waldboden ebenfalls

Mycobakterien für die Ethylenoxidation mit niedrigem $K_{m(\text{app})}$ verantwortlich sind und diese Ethylen in der oberen Bodenschicht oxidieren. Der hohe $K_{m(\text{app})}$ -Wert, der auf eine niedrigere Affinität zum Ethylen hinweist, könnte dann durch Methanotrophe oder Nitrifizierer verursacht sein, die ebenfalls in der Lage sind Ethylen zu oxidieren (Stirling und Dalton, 1979; Patel et al., 1982; Hyman und Wood, 1984; van Ginkel et al., 1987). Vergleichende $K_{m(\text{app})}$ Messungen zur Ethylenoxidation durch Methanotrophe und Nitrifizierer sind bisher jedoch noch nicht untersucht worden.

Die Ethylenakkumulation unter anoxischen Bedingungen (Abb. D.3.7, D.3.8, D.3.10, D.3.11) zeigt, daß eine mikrobielle Ethylenproduktion im Waldboden vorhanden ist die durch das Autoklavieren des Bodens deutlich verringert werden konnte (Abb. D.3.9). Eine Wechsel von Ethylenoxidation zur Ethylenproduktion wurde in Böden nach dem Verbrauch von Sauerstoff schon früher beobachtet (z.B. Elsgaard, 2001). Ethylen scheint im untersuchten Boden auch unter in-situ Bedingungen vorhanden zu sein. Die Ethylenoxidation begann ohne eine lag-Phase (Daten nicht gezeigt). Dies zeigt die vorhandene Adaption an Ethylen. In anderen Böden wurde hingegen die Ethylenoxidation erst nach einer lag-Phase beobachtet und dies auf eine Induktion der Ethylenoxidation zurückgeführt (De Bont., 1976). Die parallele Ethylenproduktion und -oxidation in Böden wurde schon früher durch die Hemmung der Ethylenoxidation mit Acetylen beobachtet. Diese führte hierbei zu einem höheren Ethylenfluß aus dem Boden (Hendrickson, 1989; Rigler und Zechmeister-Boltenstern, 1998; Zechmeister-Boltenstern und Nikodim, 1999). Die deutlich stärkere Ethylenakkumulation innerhalb der oberen 6 cm (Abb. D.3.8 und D.3.10) kann auf den höheren organischen Gehalt in diesen Schichten zurückgeführt werden, der durch den hohen Kohlenstoff und Stickstoffgehalt in den oberen Bodenschichten angezeigt wird (Abb. D.3.5). Eine positive Korrelation der Ethylenproduktion mit dem Gehalt des organischen Materials wurde ebenfalls in Untersuchungen von (Lynch und Harper 1980; van Cleemput et al., 1983; Goodlass und Smith (1978) gezeigt.

Der Zusatz von Ethylen hemmte mit steigender Konzentration deutlich die Aufnahme atmosphärischen Methans (Abb. D.3.16), so daß bei 10 ppmv Ethylen in der Gasphase die atmosphärische Methanoxidation fast vollständig unterdrückt war. Kürzlich zeigten auch Chan und Parkin (2000), daß Ethylen die Methanaufnahme von Deckboden einer Mülldeponie fast vollständig unterdrückte, wenn es in den gleichen Konzentrationen wie Methan angewendet wurde. Da die Ethylenkonzentration in manchen Böden nach starken Regenfällen stark von 0,01 ppmv auf 5 ppmv

ansteigen kann (Dowdell et al., 1972), kann eine Hemmung der Oxidation von atmosphärischem Methan in Böden durch Ethylen eine bedeutende Rolle spielen.

Der Zusatz von Methionin als Vorstufe für die Ethylenbildung (s. D.1.2). führte weder zu einer detektierbaren Ethylenakkumulation unter oxidischen Bedingungen (Ergebniss nicht dargestellt) noch zu einer gesteigerten Produktion unter anoxischen Bedingungen (Abb. D.3.11). Diese Beobachtung könnte damit erklärt werden, daß eine Limitierung an Reduktionsequivalenten auch in Anwesenheit von Methionin eine verstärkte Ethylenbildung nicht zulassen würde (Abb. D.1.1). Lynch, (1972) beobachtete, daß der Ansatz mit Methionin und Glucose eine 25fach stärkere Ethylenbildung zeigte als der Ansatz mit Methionin ohne Glucose. Die Ethylenoxidation unter oxidischen Bedingungen könnte die Detektion einer gesteigerten Ethylenproduktion ebenfalls verhindert haben.

Andererseits hatte der Methioninzusatz eine Hemmung der atmosphärischen Methanoxidation im Waldboden zur Folge (Abb. D.3.12 und D.3.13). Der Zusatz von 6,4 µmol Methionin pro Gramm frischem Boden entspricht in etwa dem Gehalt an Methionin der in verschiedenen Böden gefunden wurde (Senwo und Tabatai 1998; Beavis und Mott, 1996; Pokarzhevskii et al., 1997). Dieser Zusatz hatte eine ca. 28%ige Hemmung der atmosphärischen Methanoxidation zur Folge. Der Zusatz von 1,6 µmol Methionin pro Gramm frischem Boden, der vergleichbar mit der Methioninkonzentration pro Gramm trockener Blattmasse ist (Pokarzhevskii et al., 1997), hatte eine fast komplette Hemmung der atmosphärischen Methanoxidation zur Folge. Dies läßt darauf schließen, daß Methionin zu den Substanzen zählt, die eine Hemmung der methanotrophen Aktivität in den oberen organischen Bereichen des Bodens verursacht. Die Art der Hemmung kann jedoch nur spekuliert werden, da die Isolierung der im Waldboden molekular detektierten mikrobiellen Population von Methanotrophen bisher noch nicht gelungen ist und deshalb physiologische Untersuchungen zur Methioninhemmung, die im Waldboden auftritt, nicht möglich sind.

Ein Mechanismus, der bei der Hemmung der Methanaufnahme im Waldboden durch Methionin eine Rolle spielen kann, könnte die Hemmung durch Zwischenprodukte sein, die bei der Methioninmineralisation auftreten könnten. Im Waldboden ist ein hohes Potential für die Mineralisation von Methionin vorhanden. Gemessene „Boden induzierte Respirationsraten“ zeigen beim Zusatz der Aminosäuren L-Methionin und L-Glutaminsäure die höchsten CO₂ Produktionsraten

verglichen mit anderen Aminosäuren (O'Dowd R. et al., 1997). Der Zusatz von Methionin zu Waldboden zeigt, daß 40-60% des Methionins innerhalb von 0,5 Stunden in organisches Material aufgenommen wurde und dann innerhalb der nächsten 48 Stunden zum größten Teil mineralisiert wurde (Fitzgerald und Swank, 1984).

Ein mögliches Zwischenprodukt, welches für die Hemmung der Methanotrophen verantwortlich sein könnte, ist Methanthiol. Dieses wird z.B. beim mikrobiellen Abbau von Methionin durch *Pseudomonas spec.*, *E. coli*, *Bacillus spec.* und *Proteus vulgaris* (Pezet und Pont, 1979) und Actinomyceten und filamentösen Pilze (Segal und Starkey, 1969) gebildet. In Lactococci und *Brevibacterium linens* wurde die Methanthiolproduktion aus Methionin ebenfalls detektiert (Gao et al., 1998; Dias und Weimer, 1998 a,b) und für die direkte Bildung von Methanthiol aus Methionin eine Methionin γ -Lyase in *Brevibacterium linens* beschrieben. Methanthiol wird auch als Produkt beim Methioninabbau zu Ethylen (s. Abb. D.1.1, Thematischer Überblick) vermutet (Ince und Knowles 1986; Fukuda et al. 1989). Tatsächlich zeigte auch der Einsatz von Methanthiol im untersuchten Boden eine Hemmung der Methanoxidation (Abb. D.3.18, D.3.19), was die Hypothese der Methioninhemmung durch dessen Mineralisierung unterstützt. Durch die Ähnlichkeit des Methanthiols mit Methan und Methanol könnte man eine Hemmung der Methanmonooxygenase und/oder der Methanoldehydrogenase vermuten.

Eine Hemmung der Methanotrophen, die bei dem Zusatz von unterschiedliche Salzen ausgelöst und auf Wasserstreß zurückgeführt wurde (Schnell und King, 1996), kann genauso ausgeschlossen werden wie die Abspaltung der Amminogruppe vom Methionin, die dann zur Ammoniumhemmung führen könnte (s.o.), da der Zusatz von Ammoniumchlorid in der entsprechend höchst eingesetzten Methioninkonzentration nur eine gering veränderte Methanaufnahme zur Folge hatte (Abb. D.3.12).

Eine maximale Methanoxidation wurde sowohl im Sommer als auch im Winter in einer Tiefe von 10 bis 12 cm detektiert. Diese Lokalisierung in tieferen Bodenschichten wurde schon in früheren Studien gezeigt (Born et al., 1990; Crill, 1991; Adamsen und King, 1993; Koschorreck und Conrad, 1993; Schnell und King, 1994; Roslev et al., 1997; Amaral und Knowles 1997; Primé und Christensen, 1997). Als Ursache hierfür wurden die höheren Ammoniumkonzentrationen in den oberen Bodenschichten (Abb. D.3.6) diskutiert, da Ammonium mit Methan an der Methanmonooxygenase kompetiert (Schnell und King, 1994; Primé und Christensen, 1997). Diese Substratkompetition und

das bei der Ammoniumoxidation entstehende Nitrit können zu einer Hemmung der methanotrophen Aktivität an der Bodenoberfläche führen (Schnell und King, 1994; Dunfield und Knowles, 1995). Die Lokalisierung der Methanotrophen und der *Nitrosospira* verwandten Population in den tieferen Bodenschichten könnte ebenfalls einen gemeinsamen Ursprung haben. Amaral und Knowles (1997) zeigten, daß die Methanoxidation in der aktiven Waldbodenschicht durch wäßrige Bodenextrakte der oberen Bodenschicht bis zu 100% gehemmt wurde. Natürlich vorkommende Substanzen im Oberboden scheinen für die Hemmung innerhalb dieser Bereiche verantwortlich zu sein. Dies steht im Einklang mit der von Schnell und King (1995) gemachten Beobachtung, daß Bodenkerne die aus der Bodenschicht mit der aktiven Methanaufnahme hergestellt wurden nach einer Inkubation von 8 Wochen eine gleich hohe Methanaufnahme über die ganze Höhe aufwiesen. Hemmende Substanzen im Oberflächenboden können neben dem schon erwähnten Ammonium auch Monoterpene sein, die eine Hemmung der Methanaufnahme in Waldboden (Amaral und Knowles, 1998) und methanotrophen Reinkulturen zeigen (Amaral und Knowles, 1998; Amaral et al., 1998a). Ebenfalls ist bekannt, daß Monoterpene bedeutende Inhibitoren der Nitrifikation sowohl in einigen Waldböden (White, 1988; 1994) als auch bei *Nitrosomonas europaea* (Courtney et al., 1991) sind. Da der Monoterpengehalt in Blättern z.B. von *Umbellularia californica* bis zu 20 mg/g Trockenmasse ausmacht (Wood et al., 1995), muß angenommen werden, daß Monoterpene auch im untersuchten Laubwaldboden eine hemmende Wirkung ausüben können.

Zusammenfassend könnte man sich die fehlende methanotrophe Aktivität in den oberen 6 cm des Waldbodens im Winter folgendermaßen erklären:

Durch den Laubfall im Herbst ist vermutlich die Konzentration an Ammonium, Monoterpenen und Methionin in der oberen Bodenschicht erhöht. Der gesteigerte Wassergehalt des Bodens in dieser Jahreszeit könnte die Methanoxidation durch Diffusionslimitierung vermindern, gleichzeitig das Auswaschen von Monoterpenen aus den Blättern erhöhen (Wood et al., 1995) und die Mineralisation von Methionin steigern (Watwood und Fitzgerald, 1988). Diese Prozesse zusammengenommen könnten die deutliche Hemmung der Aktivität und das Ausbleiben einer molekularen Detektion methanotropher Organismen im Winter erklären. Im Sommer sind die Konzentrationen vermutlich wie der Wassergehalt niedriger, da z.B. viele Monoterpene ausgegast und/oder wie Methionin in den oberen Bodenschicht durch die gesteigerte mikrobielle Aktivität

abgebaut wurden. Dies hätte zur Folge, daß sich die methanotrophe Aktivität im Sommer auch hier entwickeln kann. Durch den Laubfall im Herbst wird die hemmende Wirkung erneut starten.

E. Kapitel 3

Oxidation von atmosphärischem Methan durch Reisfeldboden aus geflutetem Anbau während der Drainage

E.1 Thematischer Überblick und Zielsetzung.....	86
E.2 Material und Methoden.....	87
E.3 Ergebnisse.....	93
E.4 Diskussion.....	106

E.1 Thematischer Überblick und Zielsetzung

Böden, die kurzzeitige anoxischen Phasen durchlaufen, zeigen häufig einen Wechsel von einer Methanquelle während der anoxischen Phase, zu einer Nettosenke während der oxischen Phase (Harris et al., 1982; Yavitt et al., 1995; Wang und Bettany, 1995; Ambus und Christensen, 1995; Silver et al., 1999; Wickland et al., 1999). Hierzu gehören auch regenbewässerte Reisfelder, die atmosphärisches Methan während kurzzeitiger Perioden der Wassersättigung emittieren und zu Zeitpunkten ohne Wassersättigung aufnehmen (Singh et al., 1998a). Felder mit einer Fruchtfolge von Reis und Weizen sind ebenfalls Methanquellen während des gefluteten Reisanbaus und Methansenken während der Weizenkultivierung (Singh et al., 1996, 1998b). Ob jedoch Böden aus einem kontrolliert gefluteten Reisanbau ohne Fruchtfolge nach der letzten Drainage ebenfalls eine Senke für atmosphärisches Methan sein können, wurde bisher noch nicht untersucht und ist ein Teil dieser Arbeit. Möglich erscheint dies durch die Beobachtung einer hoch- und niedrig- affinen Methanoxidation (s. Allgemeine Einleitung A.3) in einem Boden dieser Anbaumethode (Bender und Conrad, 1992).

E.2 Material und Methoden

E.2.1 Labor Experimente mit Reisfeldboden

Alle Laborexperimente wurden mit dem lehmigem Reisfeldboden aus Vercelli durchgeführt.

E.2.1.1 Vorinkubation des Bodens

Um atmosphärische Methanaufnahme des Bodens zu induzieren wurde der Boden auf einen Wassergehalt von 67,8 % WHK eingestellt. Hierzu wurde der trockene Boden (200-600 g) in einer Plastikschaale ausgebreitet und mit einem Wassersprüher auf der Waage bis zum entsprechenden Gewicht mit demineralisiertem Wasser besprüht. Anschließend wurde der Boden gut durchmischt und durch ein 2 mm Sieb gedrückt. Die so erhaltenen Bodenaggregate wurden in einen 3 l Erlenmeyerkolben gefüllt und mit einem Gummistopfen verschlossen. Textilklebeband verhinderte das Ablösen des Stopfens während und nach der Injektion von 100%igem Methan. Das Methan wurde mittels Kolbenprober bis zu einer Endkonzentration von ca. 20% hinzugegeben. Anschließend wurde der Ansatz bei 25°C im Dunkeln inkubiert. Alle 3-4 Tage wurde der Gummistopfen entfernt, die Atmosphäre gegen Raumluft ausgetauscht, verschlossen und erneut eine Atmosphäre mit 20% Methan hergestellt. Nach einer Inkubation von 1-2 Wochen unter diesen Bedingungen wurde der Boden erneut durch ein Sieb der Maschenweite 2 mm gedrückt und für die Versuche verwendet.

E.2.1.2 Methanoxidation und -produktion bei unterschiedlichen Wassergehalten

Zur Messung der Methanoxidation wurde vorinkubierter Boden in 5 g Aliquoten in 80 ml Glasflaschen in dreier Parallelen gefüllt und auf eine Waage gestellt. Mit einem Kaltluftfön wurde so lange belüftet bis der gewünschte Wassergehalt eingestellt war. Ein erhöhter Wassergehalt wurde durch zusätzliches Besprühen erreicht. Die Gefäße wurden mit Gummistopfen verschlossen und bei 25°C im Dunkeln inkubiert. Zur Probennahme wurden mit einer Pressure-Lok Spritze (Dynatech Precision Sampling Corp.) Gasproben entnommen und die Veränderung der Methankonzentration (initiale Konzentration 1,75 ppmv) durch 7 Messungen über einen Zeitraum von 40 Stunden bestimmt.

Die Methanproduktion wurde bei verschiedenen Wassergehalten des Bodens bestimmt. Dazu wurde in dreier Parallelen jeweils 10 g trockener Boden mit deionisiertem Wasser auf unterschiedliche Wassergehalte eingestellt. Der Boden wurde unter einer Stickstoffatmosphäre in Müller & Krempel Flaschen (150 ml) inkubiert. Die Methankonzentration wurde nach 5 und nach 30 Tagen Inkubation bei 25 °C im Dunkel bestimmt.

E.2.1.3 Einfluß der Bodentextur auf die atmosphärische Methanoxidation

Vercelli-Boden mit einem gravimetrischen Wassergehalt von 67,8 % WHK wurden in folgenden Ansätzen mit sterilem Quarzsand (Merck) gemischt:

- | | | |
|----|-------------|-------------------|
| 1. | 200 g Boden | ohne Quarzsand |
| 2. | 200 g Boden | + 200 g Quarzsand |
| 3. | 200 g Boden | + 400 g Quarzsand |

Die Ansätze wurden jeweils in einem 3 l Erlenmeyerkolben gefüllt und wie unter 2.1.2 beschrieben unter einer 20%igen Methanatmosphäre inkubiert. Anschließend wurden die potentielle Methanoxidationsrate bei atmosphärischen Methankonzentrationen gemessen.

Zusätzlich wurde nach der Inkubation ein Aliquot des ohne Quarzsand inkubierten Bodens mit Quarzsand im Verhältnis 1:1 gemischt und wiederum die atmosphärische Methanoxidation gemessen.

E.2.1.4 Einfluß von Ferrihydrit auf die Methanoxidation und Methanproduktion

Um den Einfluß von Ferrihydrit auf die Methanoxidation im Reisfeldboden zu testen, wurden folgende Ansätze gemacht::

- | | | | |
|----|-------------------|--------------|--------------------|
| 1. | 80 g Verceliboden | +20 g Wasser | |
| 2. | 80 g Verceliboden | +20 g Wasser | +0,6 g Ferrihydrit |
| 3. | 80 g Verceliboden | +20 g Wasser | +1,2 g Ferrihydrit |

Die Ansätze wurden nachdem sie durch ein 2 mm Sieb gedrückt wurden, in Bechergläser gefüllt und unter 20% Methan in Raumluft bei 25°C in einem Anaerobentopf inkubiert.

Die Oxidation von Methan wurde verfolgt, indem drei Parallelen mit je 15 g Frischgewicht in Müller & Krempel Flaschen umgefüllt, mit Naturgummistopfen und Alu-Schraubdeckel verschlossen und die Methanabnahme über einen Zeitraum von 24 h mit 6 Meßpunkten detektiert wurde.

Im Anschluß an diese Messung wurde jeweils 2 x 5 g aus einer der drei Parallelen auf zwei weitere Müller & Krempel Flaschen aufgeteilt und die Atmosphäre gegen Stickstoff ausgetauscht um die initiale Methanproduktion zu messen.

E.2.1.5 Einfluß der Aggregatgröße auf die Methan- und Sauerstoffaufnahme

a) Atmosphärische Methanaufnahme nach der Vorinkubation

Der vorinkubierte Boden wurde durch einen Fleischwolf gedrückt, dabei erlaubten Lochscheiben mit Durchmessern von 2, 4, 6, 8 und 10 mm Bodenaggregate dieser Größe herzustellen. Die Bodenaggregate wurden auf 80 ml Glasflaschen verteilt, die mit Gummistopfen verschlossen wurden. Es wurden jeweils drei Parallelen jeder Aggregatgröße hergestellt und die potentielle atmosphärische Methanoxidation über die Abnahme der Konzentration mit der Zeit detektiert. Es wurden über einen Zeitraum von 70,5 h sechs Messpunkte mit jeweils 1 ml genommen. Am Ende wurde ebenfalls der Sauerstoffgehalt in jeweils einem der Parallelansätze gemessen.

b) Aufnahme hoher Methankonzentration während der Vorinkubation

Noch nicht vorinkubierter Boden mit einem Wassergehalt von 68,7% WHK wurde in Aggregate der Durchmesser 2, 4, 6, 8 und 10 mm gepresst. Jeweils 3 x 5 g der unterschiedlichen Aggregate wurden auf Müller & Krempel Flaschen (150 ml) verteilt. Zur Atmosphäre (Raumluft) wurde Methan bis zur Endkonzentration von 20% zugesetzt. Die Methanabnahme wurde durch Probennahmen über den Inkubationszeitraum bestimmt. Die Sauerstoffkonzentration wurde zu zwei unterschiedlichen Zeitpunkten aus jeweils einer der drei Parallelen bestimmt.

E.2.2 Unbepflanzte Mikrokosmen

E.2.2.1 Methanemission und -oxidation durch Reisfeldbodenkerne

Um den Methanfluß der Bodenkerne während der Abtrocknung zu verfolgen, wurden jeweils 50 g Boden in Plexiglasröhren (Länge: 10 cm, i.D.: 3,4 cm) gefüllt, die unten mit grauen Gummistopfen

verschlossen waren. In zwei weiteren Ansätzen wurde zu den 50 g Boden 16,6 g Quarzsand (Merck) von 100-200 µm oder 200-400 µm Durchmesser gegeben, um eine andere Bodentextur zu simulieren. Demineralisiertes Wasser wurde bis zur Flutung des Bodens zugegeben. Die Wassersäule über dem Bodenkern wurde während des gesamten Inkubationszeitraums auf 1 bis 2 cm geregelt. Die Inkubationszeit betrug 6 Wochen bei einer Temperatur von 25°C im Dunkeln.

Nach 6 Wochen wurde das Flutungswasser entfernt und die Kerne weiter bei 25°C im Dunkeln inkubiert. Über Gewichtsbestimmung des gesamten Bodenkerns wurde der Wasserverlust detektiert. Die Methanemission wurde verfolgt, indem der Bodenkern mit einem Gummistopfen verschlossen wurde und die Zunahme der Methankonzentration über die Zeit gemessen wurde. Die Methanemission wurde unter atmosphärischen Bedingungen sowie unter Stickstoffatmosphäre bestimmt. Die Differenz der beiden Messungen ergab den Teil an Methan der durch methanotrophe Organismen unter oxischen Bedingungen oxidiert worden war.

E.2.2.2 Potentielle Methanoxidation und -produktion im Tiefenprofil

Um zu überprüfen, ob das Potential zur Oxidation atmosphärischer Methankonzentration im Reisfeldboden nach und während der Flutung vorhanden ist, wurden mehrere Plastikbecher (10 x 20 x 10 cm) mit Boden gefüllt. Diese Becher wurden in eine große PVC-Wanne der Maße (80 x 40 x 25 cm) mit demineralisiertem Wasser gestellt, so daß eine Wassersäule von ca. 5 cm über dem Boden vorhanden war. Um eine homogene Verteilung des Wassers in Boden zu gewährleisten, wurde zu Beginn der Flutung der Boden einmal mit einem Holzstock durchmischt. Die Inkubation erfolgte im Gewächshaus. Der lehmige sowie der sandige Boden aus Vercelli wurden über 6 bzw. 10 Wochen inkubiert.

Am Ende der Flutungszeit wurde die Drainage eingeleitet, indem Löcher (8 mm Durchmesser) mit einer Bohrmaschine, ca. 1-2 cm vom Boden entfernt, in die Seitenwände der Plastikbecher gebohrt wurden und das Flutungswasser aus der Plastikwanne entfernt wurde. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach dem Start der Drainage wurden jeweils zwei Plastikbecher genutzt, um mit Plexiglasröhren, die (6 cm Innendurchmesser) einseitig geschärfte Kanten hatten, Bodenkerne herauszustechen. Hierzu wurde das Plexiglasrohr in den Boden getrieben, mit einem Gummistopfen

verschlossen und anschließen vorsichtig unter leichtem Drehen wieder herausgezogen. Aus jedem Plastikbecher wurden zwei Bodenkerne herausgestochen.

Eine PVC-Rundscheibe (Außendurchmesser: 5,9 cm), die exakt in die verwendeten Plexiglasröhren passte, erlaubte es den Bodenkern über eine Gewindestange definiert aus dem Rohr zu schieben. Hierbei entsprach eine Umdrehung der Gewindestange 1 mm Vorschub der Rundscheibe. Das Plexiglasrohr und die Gewindestange waren über ein Stativ fixiert. Mittels Edelstahlbraut wurde der herausragende Bereich vom Bodenkern abgeschnitten und in eine Müller & Krempel Flasche (150 ml) übertragen. Die ersten 10 mm wurden in 5 Scheiben a 2 mm geschnitten, der Bereich 10 - 30 mm in 5 mm Schichten unterteilt und ein letzter Schnitt entsprach dem Bereich von 30 - 40 mm Tiefe. Drei der geschnittenen Bodenkerne wurden unter Raumluftatmosphäre inkubiert, während die Schnitte des vierten Kernes unter einer Stickstoffatmosphäre inkubiert wurden. Die Messung der Methankonzentration über einen Zeitraum von bis zu 3 Tagen erlaubte die Bestimmung der Oxidations- bzw. Produktionsraten von Methan. Die Erfassung des Leergewichtes der Flaschen sowie der eingewogenen Bodenscheiben erlaubten nach dem Experiment durch Trocknen bei 105°C die Bestimmung des Wassergehaltes und des Trockengewichtes.

E.2.3 Bepflanzte Mikrokosmen

Die Experimente wurden sowohl mit lehmigem als auch mit sandigem Reisfeldboden aus Vercelli durchgeführt.

E.2.3.1 Methanemission während der Drainage

Um die Methanemission während der Drainage auch an bepflanzten Systemen zu untersuchen, wurde sowohl der sandige als auch der lehmige Boden aus Vercelli für die Versuche eingesetzt. Hierfür wurden für jeden Bodentyp zwei PVC-Wannen (40 x 30 x 22 cm) mit trockenem Boden gefüllt, so daß ca. 5 cm bis zum oberen Rand frei blieben. Der Boden wurde mit demineralisiertem Wasser überflutet und mit einem Holzstab gerührt. Dabei wurde solange Wasser zugesetzt, bis der Boden wassergesättigt und die Wanne bis zum oberen Rand geflutet war. Nach einer Woche Inkubation im Gewächshaus wurden 12 Reissämlinge pro Wanne gepflanzt. Die Mikrokosmen wurden bis zur Reife

der Körner unter gefluteten Bedingungen weiter inkubiert. Die Drainage wurde dann durch Bohrungen, von 8 mm Durchmesser, im unteren Bereich der Wannenwände eingeleitet.

Während der Drainage wurde die Methanemission mit Hilfe einer zweiteiligen Flußkammer, bestehend aus einem Plexiglasboden und einem -deckel (je 45 cm x 35 cm x 50 cm) gemessen. Beide Teile wurden durch Schrauben eng aneinandergedreht, so daß ein Gummiring dazwischen für eine Abdichtung sorgte. Ein Ventilator im Deckel sorgte für eine homogene Atmosphäre in der Kammer. Die Gasprobe zur Bestimmung der Methankonzentration wurden durch zwei Septen im Deckel genommen. Kurz nach Beginn der Drainage erfolgte die Messung beider Parallelen kurz hintereinander. Später wurde jeweils nur ein Mikrokosmos gemessen, da nur eine Flußkammer zur Verfügung stand und die Emissionsraten so gering waren, daß ein Meßzeitraum von bis zu 3 Tagen benötigt wurde.

E.2.3.2 Potentielle Methanoxidation im Tiefenprofil

Nach 33 und 34 Tagen wurde aus den bepflanzten Mikrokosmen Bodenkerne gestochen. Der Kern aus dem lehmigen Vercelli Boden wurde in 2 cm Schichten unterteilt während der Kern aus dem sandigem Boden in 1 cm Schnitte zerteilt wurde. Die unterschiedlichen Schichten wurden in Müller & Krempel Flaschen (150 ml) übertragen, mit Naturgummistopfen verschlossen und unter Raumlufatmosphäre inkubiert. Die Methankonzentration wurde über einen Zeitraum von 4 Tagen verfolgt.

E.3 Ergebnisse

Während viele oxische und kurzzeitig anoxische Böden als Senke für atmosphärisches Methan bekannt sind, sollte die Rolle gefluteter Reisfeldböden während und nach der Drainage als Senke für atmosphärisches Methan mit folgenden Experimenten untersucht werden.

E.3.1 Experimente mit vorinkubiertem Boden

E.3.1.1 Einfluß des Wassergehaltes auf die Methanoxidation und -produktion

Reisfeldboden mit 68,7 % WHK, der unter einer 20%igen Methanatmosphäre vorinkubiert und anschließend mit einem Kaltluftfön auf unterschiedliche Wasserhaltekapazitäten eingestellt wurde, zeigte ein leichtes Optimum der Methanaufnahme mit $0,077 \text{ nmol g-TB}^{-1} \text{ h}^{-1}$ im Bereich von 40% WHK (Abb. E.3.1A) unter atmosphärischen Bedingungen. Unterhalb von 20% WHK war keine Methanaufnahme mehr detektierbar und es konnte stattdessen eine Methanproduktion von $0,0095 \text{ nmol}$ und $0,0245 \text{ nmol g-TB}^{-1} \text{ h}^{-1}$ gemessen werden (Abb. E.3.1A).

Die Inkubation von Reisfeldboden unterschiedlichen Wassergehaltes unter Stickstoff zeigte, daß eine Methanproduktion über den gesamten Bereich der eingestellten Wassergehalte detektierbar war (Abb. E.3.1B). Die Methanproduktion war bei steigendem Wassergehalt durch eine Zunahme im Bereich von 23 bis 56% WHK gekennzeichnet. Die weitere Erhöhung des Wassergehaltes bis zu 250% WHK hatte keine zusätzliche Steigerung der Methanproduktion zur Folge.

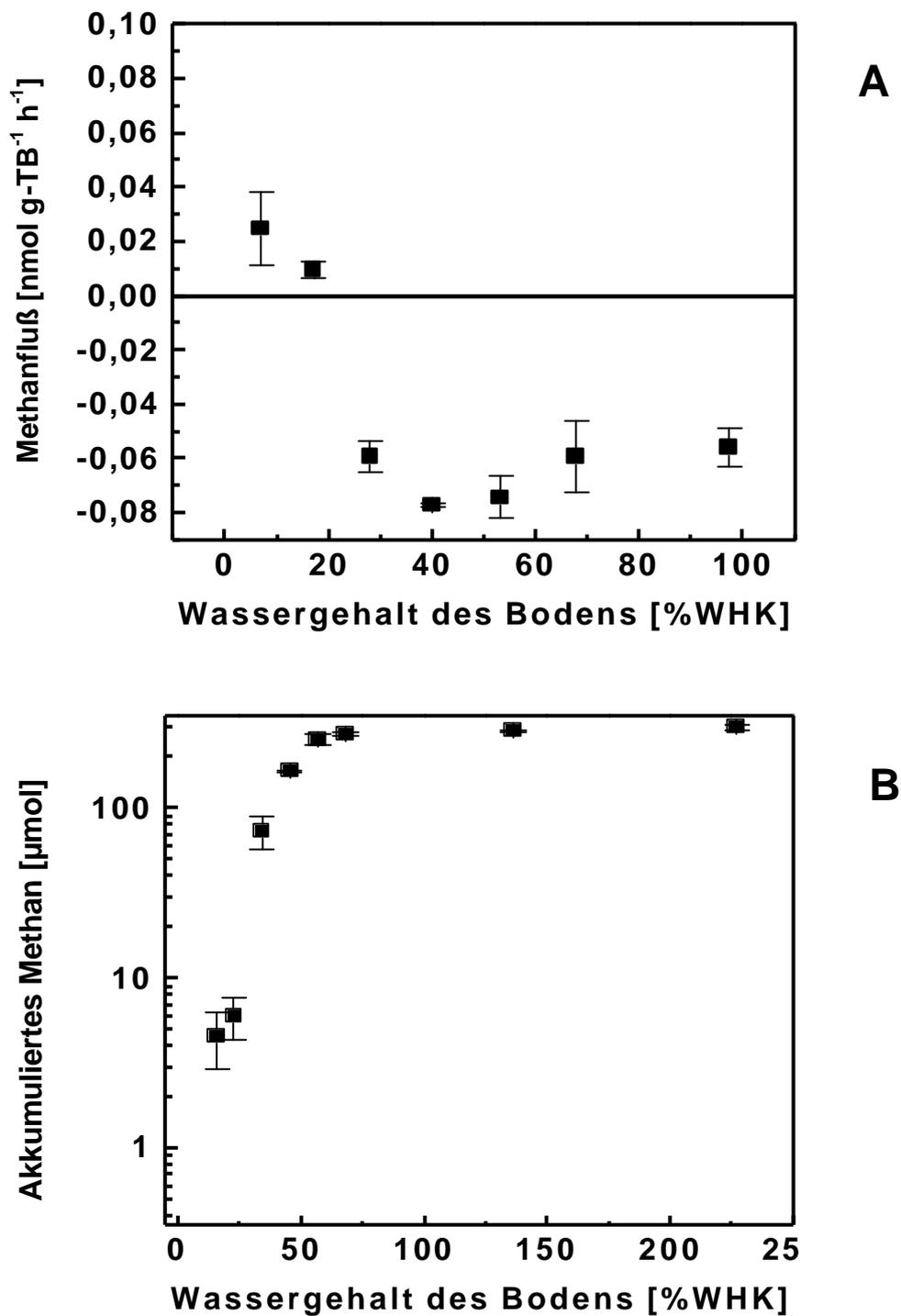


Abb. E.3.1: Methanfluß unter atmosphärischen Bedingungen (A) und akkumuliertes Methan nach 30 Tagen unter Stickstoffatmosphäre (B) von Reisfeldboden in Abhängigkeit vom Wassergehalt. Der Boden unter atmosphärischen Bedingungen wurde im Gegensatz zu dem Ansatz mit Stickstoffatmosphäre unter Luft mit 20% Methan vorinkubiert. Die Werte sind Mittelwerte von $n=3 \pm \text{SD}$.

E.3.1.2 Einfluß der Aggregatgröße auf die Methan- und Sauerstoffaufnahme

Vorinkubierter Boden wurde mit einem Fleischwolf auf Aggregate unterschiedlichen Durchmessers (2, 4, 6, 8 und 10 mm) gebracht. Der zeitliche Verlauf der Methankonzentration zeigte, daß in allen Ansätzen initial eine Abnahme der atmosphärischen Methanmischungsverhältnisse stattfand (Abb. E.3.2A-E). Im Gegensatz zu den Ansätzen mit Aggregaten von 2, 4 und 6 mm Durchmesser konnte in den Ansätzen mit 8 und 10 mm Aggregatdurchmesser beobachtet werden, daß die Methankonzentration nach initialer Methanabnahme anstieg (Abb. E.3.2A-E).

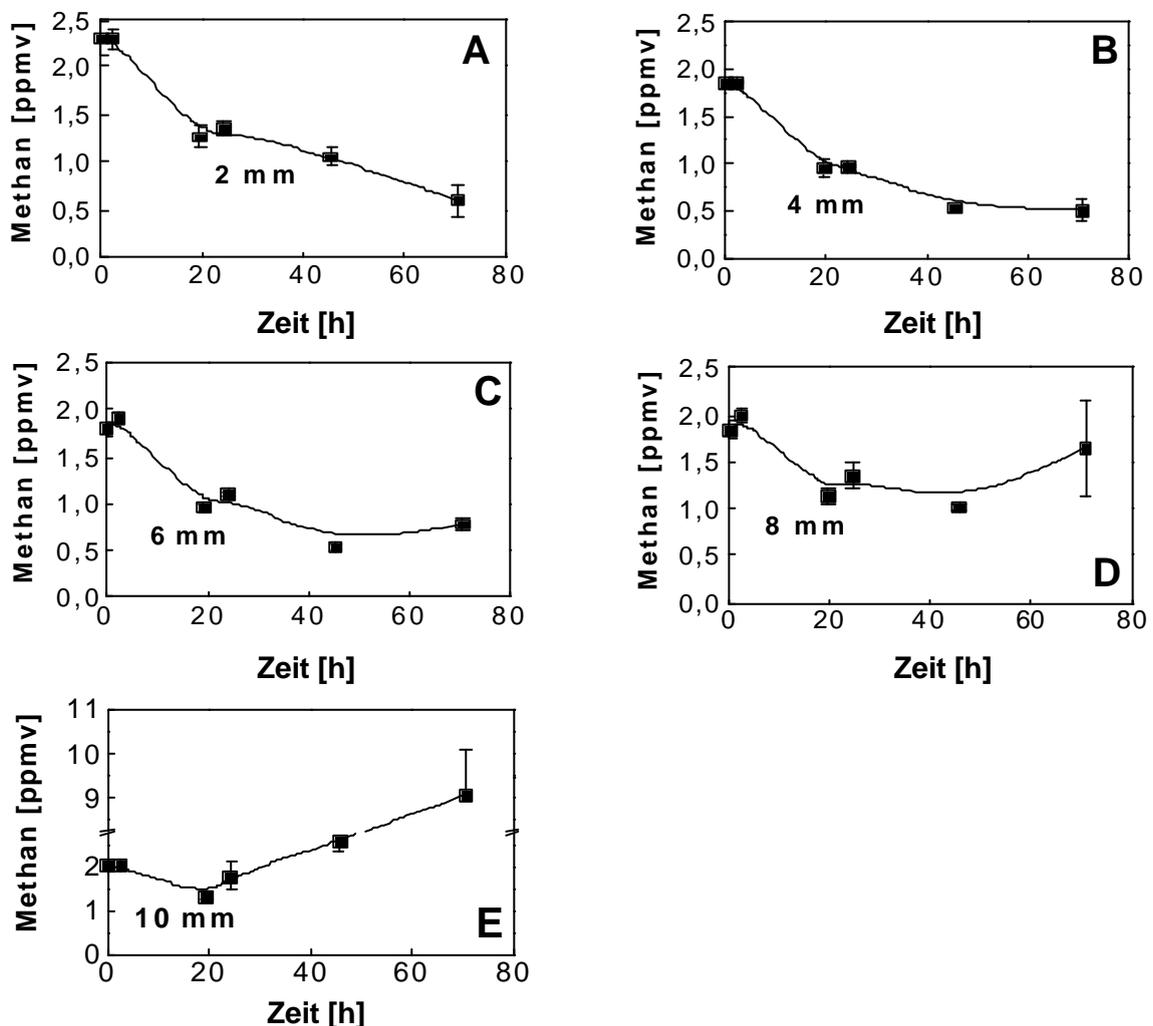


Abb. E.3.2: Verlauf der Methankonzentration in Inkubationen mit Reisfeldboden unterschiedlicher Aggregatdurchmesser (A) 2 mm, (B) 4 mm, (C) 6 mm, (D) 8 mm und (E) 10 mm. Der Boden wurde vor der Messung unter hohen Methankonzentration (20% v/v) vorinkubiert. Die Werte zeigen Mittelwerte von $n = 3 \pm \text{SD}$.

Mit zunehmendem Aggregatdurchmesser zeigte sich, daß die geringsten Methanwerte 0,4 - 0,5 ppmv bei den Aggregaten 2, 4 und 6 mm erreicht wurden (Abb. E.3.2A-C), während die Aggregate der Durchmesser 8 und 10 mm 1 bzw. 1,3 ppmv nicht unterschritten (Abb. E.3.2D-E).

Die Messung der Methankonzentration während der Vorinkubation von Boden unterschiedlicher Aggregatgröße zeigte (Abb. E.3.3), daß alle Ansätze, innerhalb der ersten 100 Stunden eine ähnlich lineare Methanabnahme aufwiesen. Die Methankonzentration nahm jedoch nach 100 Stunden in den Ansätzen mit der Aggregatgröße 2, 4 und 6 mm deutlich steiler ab, während die Konzentrationsabnahme in den Ansätzen mit 8 und 10 mm Aggregaten weiterhin mehr oder weniger linear verlief.

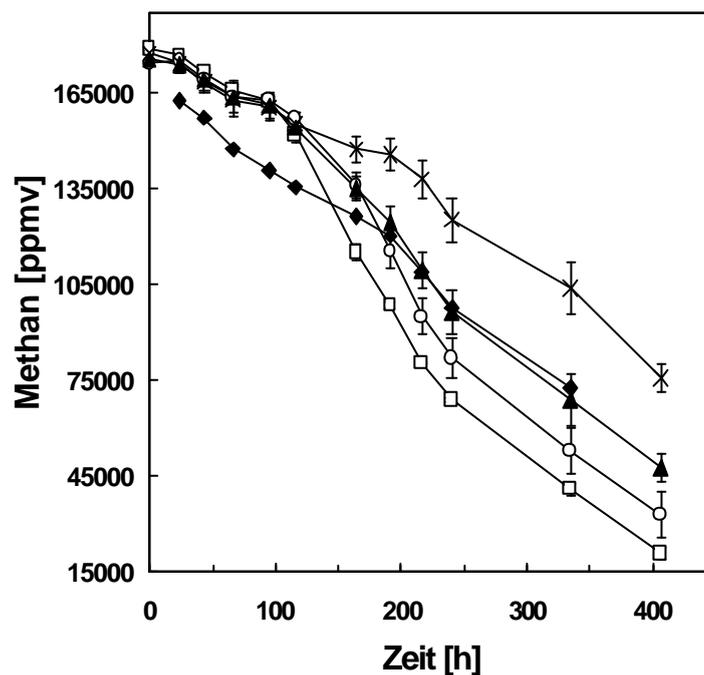


Abb. E.3.3: Verlauf der Methankonzentration in Reisfeldbodeninkubationen. Der Boden wurde mit einem Fleischwolf in Aggregate der Durchmesser 2 mm (□), 4 mm (○), 6 mm (▲), 8 mm (◆) und 10 mm (X) gebracht. Die Werte zeigen Mittelwerte von $n = 3 \pm \text{SD}$.

Die Detektion des Methan- und Sauerstoffverbrauches während der Vorinkubation mit hohen Methankonzentrationen, sowie nach der Vorinkubation bei atmosphärischen Methanmischungsverhältnissen zeigte, daß mit steigender Aggregatgröße sowohl der Sauerstoffverbrauch als auch der Methanverbrauch abnahm (Tab. E.3.1).

Tabelle E.3.1: Methan- und Sauerstoffaufnahme durch Reisfeldbodenaggregate unterschiedlicher Durchmesser. Ansatz **(A)** zeigt die Aufnahme von Aggregaten während der Vorinkubation bei hohen Methanmischungsverhältnissen und **(B)** die Aufnahme unter atmosphärischer Bedingung durch Aggregate, die erst nach der Vorinkubation hergestellt wurden. Die Detektion der Sauerstoffaufnahme erfolgte durch Zweipunktmessung jeweils einer Probe. Die Rate der atmosphärischen Methanaufnahme wurde für die Initialkonzentration bestimmt. Die Methanaufnahme im Ansatz A wurde durch lineare Regression der maximalen Methanabnahme bestimmt.

Ansatz	Aggregate	O ₂ -Aufnahme	CH ₄ -Aufnahme
	Ø (mm)	[µmol g-FB ⁻¹ h ⁻¹]	[nmol g-FB ⁻¹ h ⁻¹]
A	2	1,30	810
	4	1,06	743
	6	0,75	559
	8	0,63	338
	10	0,55	284
B	2	0,47	0,0114
	4	0,43	0,0072
	6	0,30	0,0063
	8	0,32	0,0027
	10	0,25	0,0035

E.3.1.3 Einfluß der Textur auf die Methanoxidation von Reisfeldboden

Um den Einfluß der Textur auf die Methanoxidation zu testen, wurde Boden mit unterschiedlichen Mengen Sand gemischt, mit gleicher Menge Wasser versetzt und unter 20% Methanatmosphäre vorinkubiert. Der Verlauf der atmosphärischen Methankonzentration wurde anschließend über die Zeit aufgenommen (Abb. E.3.4) und zeigte, daß die Methankonzentrationen in den

Bodeninkubationen mit Sand ($0,1 \text{ nmol g-FB}^{-1}$) etwa 3 mal schneller abnahmen als ohne Sandzusatz ($0,03 \text{ nmol g-FB}^{-1}$). Eine weniger starke aber dennoch deutlich gesteigerte Abnahme zeigte der Ansatz, dem erst nach der Inkubation bei hohen Methanmischungsverhältnissen Sand zugesetzt wurde. Die Methanaufnahmerate mit $0,05 \text{ nmol g-FB}^{-1}$ war hier etwa doppelt so hoch wie ohne Sand (nicht gezeigt).

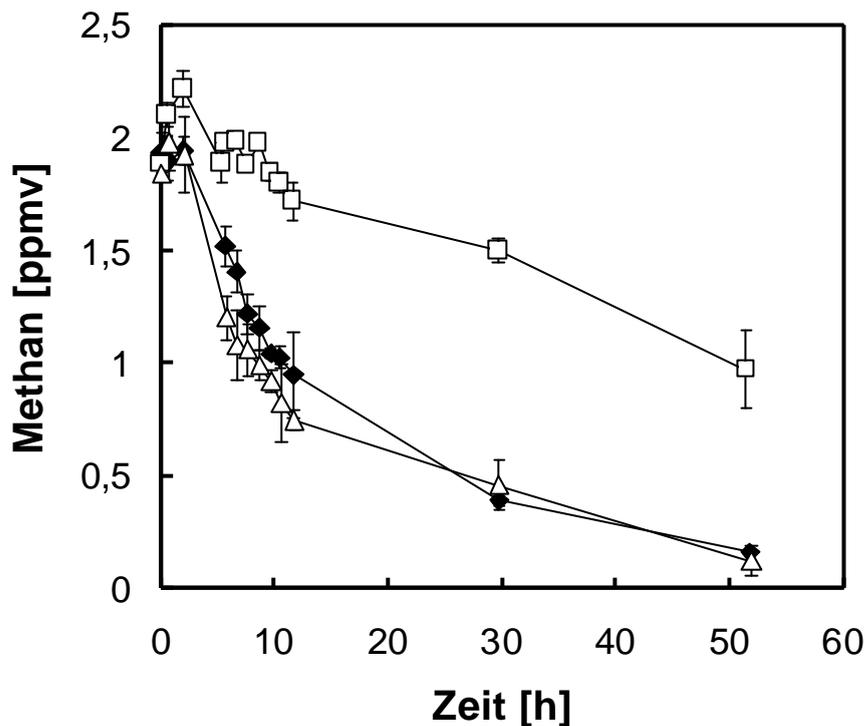


Abb. E.3.4: Verlauf der Abnahme atmosphärischer Methankonzentration in Reisfeldbodeninkubationen. Dem Boden wurde vor der Inkubation mit hohen Methanmischungsverhältnissen (20% (v/v)). Sand im gleichen Verhältnis (1:1) (◆), im doppelten Verhältnis (2:1) (△) bzw. kein Sand (□) zugesetzt. Die Werte zeigen Mittelwerte von $n = 3 \pm \text{SD}$.

E.3.1.4 Einfluß des Eisengehaltes auf die Methanoxidation von Reisfeldboden

Der Zusatz von Ferrihydrit zu anoxischen Bodenaufschlämmungen verringert deutlich die Methanproduktion im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollansätzen. Der Zusatz von zwei unterschiedlichen Ferrihydritmengen zu Reisfeldboden vor der Inkubation unter hohen Methankonzentrationen sollte eine Methanproduktion in eventuell auftretenden anoxischen Mikronischen vermindern und somit den Einfluß der Methanproduktion auf die Methanaufnahmemenge wiedergeben.

Die Bodeninkubation mit $15 \text{ mg Ferrihydrit pro Gramm Reisfeldboden}$ zeigte mit $0,15 \text{ nmol h}^{-1}$

g-FB⁻¹ eine um 64% gesteigerte Methanaufnahme als der Kontrollboden (Abb. E.3.5A). Der Ansatz mit 7,5 mg Ferrihydrit pro Gramm Reisfeldboden zeigte hingegen ein nur um 13% gesteigerte Aufnahme. Die atmosphärischen Methankonzentrationen zu Beginn des Versuches waren jedoch in allen Bodenansätzen auf Werte um 0,14 ppmv abgesunken (Abb. E.3.5A).

Die Inkubation des Bodens unter anoxischen Bedingungen im Anschluß zeigte, daß in den Ansätzen mit 7,5 Milligramm bzw. 15 Milligramm Ferrihydrit pro Gramm Boden eine um 40% bzw. 87% geringere Methanproduktion detektiert werden konnte als in der Kontrolle mit 0,33 nmol Methan pro Gramm frischem Boden und Stunde (Abb. E.3.5B).

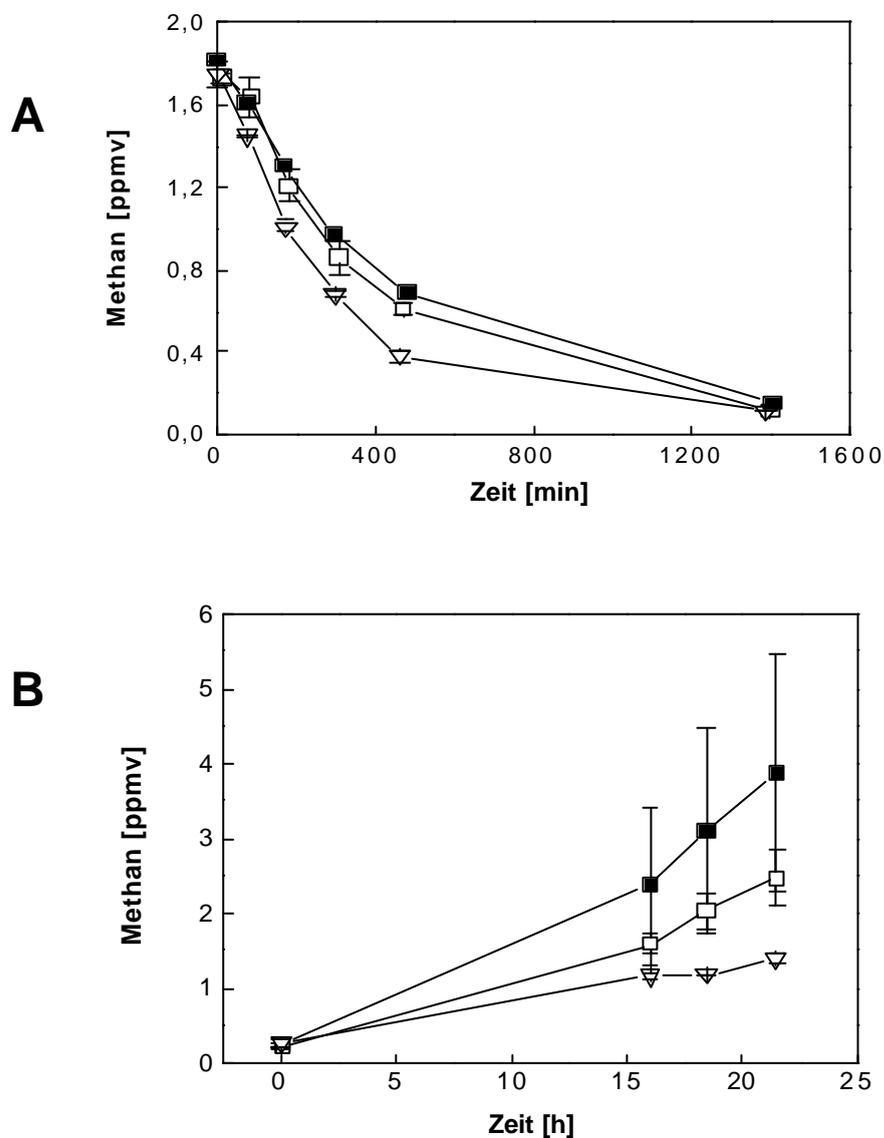


Abb. E.3.5: Verlauf der Methankonzentrationen in Reisfeldbodeninkubationen (A) unter atmosphärischen und (B) unter anoxischen Verhältnissen. Dem Boden wurde vor der Inkubation mit hohen Methanmischungsverhältnissen (20% (v/v)) 7,5 mg Ferrihydrit (□) pro Gramm trockenem Boden, 15 mg Ferrihydrit (▽) pro Gramm trockenem Boden oder kein Ferrihydrit zugesetzt (■). Die Werte zeigen Mittelwerte von $n = 3 \pm SD$.

E.3.2 Unbepflanzte Mikrokosmen

E.3.2.1 Methanproduktion und -aufnahme durch unbepflanzte Bodenkerne

Mikrokosmen mit unterschiedlichen Sandzusätzen, die 6 Wochen im Dunkeln und geflutet inkubiert wurden, zeigten unabhängig vom Sandzusatz eine lineare Abnahme des Wassergehaltes (Abb. E.3.6A-C). Innerhalb von 23 Tagen war in allen Ansätzen der Wassergehalt von ca. 105-120% WHK auf 5-7% WHK abgesunken.

Innerhalb der ersten 6 Tage konnte eine bis zu 99fach stärkere Methanemissionsrate unter Stickstoffatmosphäre als unter Raumluft beobachtet werden. Am 9. Tag stieg die Methanemissionsrate in allen Ansätzen stark an, was auf Rissbildung in der Oberfläche zurückzuführen war und eine definierte Methanemissionsmessung nicht erlaubte. In den Ansätzen ohne Quarzsand bzw. mit 100-200 µm grobem Sand konnte am 13. Tag kein Unterschied zwischen der Methanemission unter Stickstoff- oder Raumluftatmosphäre detektiert werden (Abb. E.3.6A,B). Im Ansatz mit einem Quarzsand des Durchmessers 200-400 µm war die Methanemission unter atmosphärischen Bedingungen größer als unter Stickstoff (Abb. E.3.6C).

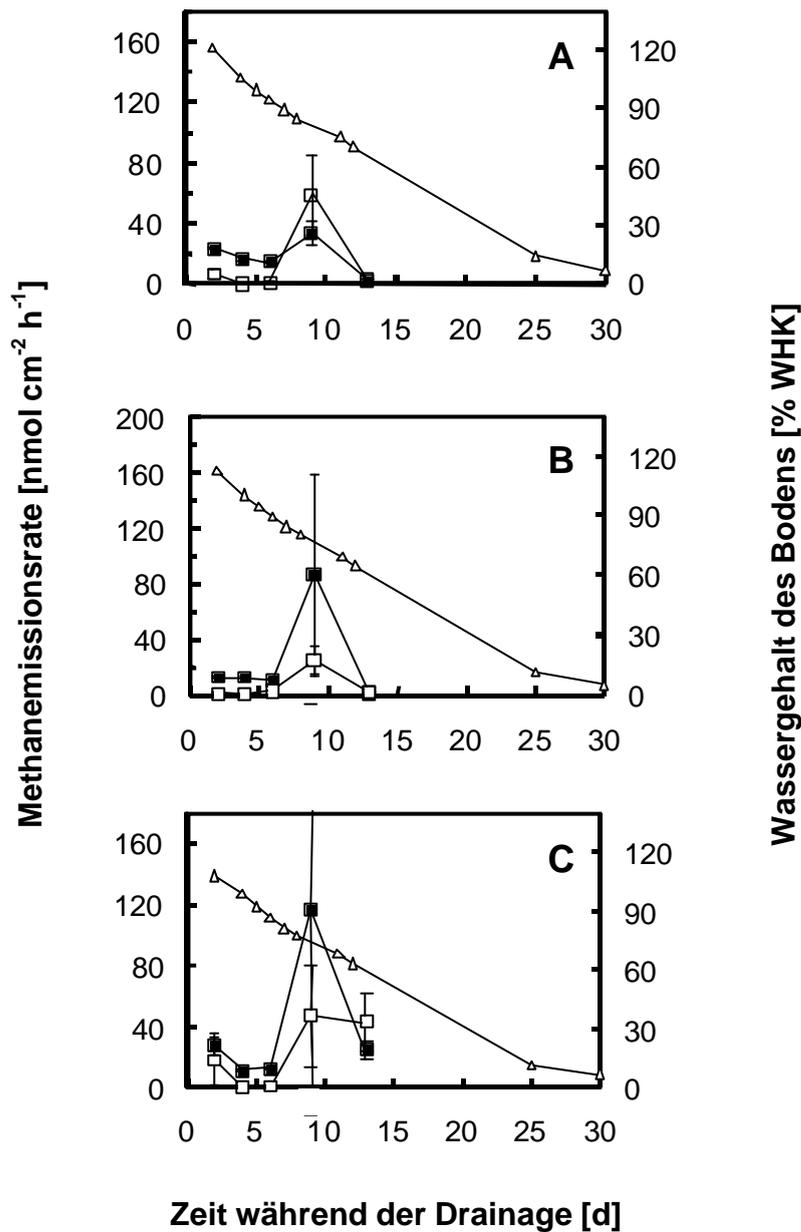


Abb. E.3.6: Vergleich der Methanemissionsraten während der Drainage. Unter Raumluft (\square) und Stickstoffatmosphäre (\blacksquare) von unbepflanzten Mikrokosmen mit 50 g Boden (A), 50 g Boden versetzt mit 16,6 g Quarzsand (\varnothing 100-200 μm) (B) und 50 g Boden versetzt mit 16,6 g Quarzsand (\varnothing 200-400 μm) (C). Die Abnahme der Wasserhaltekapazität (Δ) wurde ebenfalls verfolgt. Die Werte zeigen Mittelwerte von $n = 3 \pm \text{SD}$.

E.3.2.2 Methanaufnahme und –produktion von unterschiedlichen Bodenschichten

Die potentielle Aufnahmekapazität für atmosphärisches Methan durch unterschiedliche Bodenschichten wurde bestimmt, nachdem Bodenkerne zu unterschiedlichen Zeitpunkten während der Drainage in Scheiben geschnitten wurden.

Die oberen 2 mm der Bodenkerne zeigten einen Tag nach Beginn der Drainage das Potential, atmosphärisches Methan mit einer Rate von $0,33 \pm 0,14 \text{ nmol g-TB}^{-1} \text{ h}^{-1}$ aufzunehmen, während tieferen Schichten dieses Potential nicht hatten. Die Aufnahme von atmosphärischem Methan am 4. und 8. Tag nach der Drainage, war bis zu einer Tiefe von 8 mm detektierbar (Abb. E.3.7B, C). Am 4. Tag war die Aufnahme jedoch mit zunehmender Tiefe 3-4fach geringer und am 8. Tag bis zu 8fach geringer. Das Potential, atmosphärisches Methan zu oxidieren, war am 11. Tag nach dem Einleiten der Drainage nicht mehr nachweisbar.

Am ersten Tag war der Wassergehalt in allen Ansätzen von 250% WHK in der Oberfläche und 100% WHK im unteren Bereich auf einen Wert von 70 bzw. 50% WHK am 8. Tag gefallen (Abb. E.3.7A-C). Der Wassergehalt am 11. Tag lag an der Oberfläche bei 20% und im unteren Bereich bei 25% WHK.

Die potentielle Methanproduktion war zu allen gemessenen Zeitpunkten, während der Drainage, über die gesamte Tiefe vorhanden. Vom ersten bis zum 11. Tag nahm sie durchschnittlich von $0,15 \text{ nmol g-TB}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ca. 30fach auf $0,005 \text{ nmol g-TB}^{-1} \text{ h}^{-1}$ drastisch ab (Abb. E.3.7A-D).

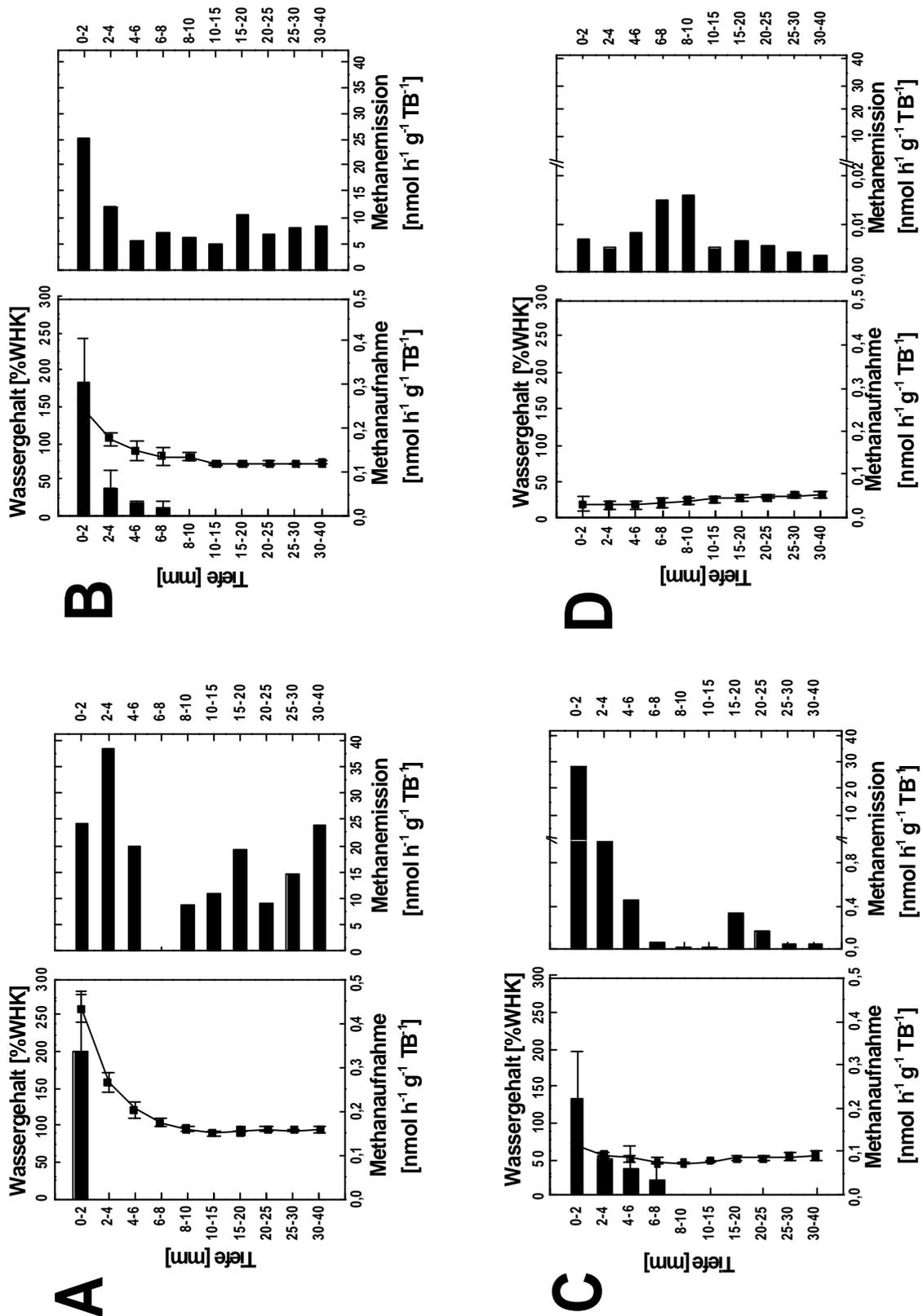


Abb. E.3.7: Potentielle Methanproduktion ($n = 1$) und Aufnahme atmosphärischen Methans ($n = 3 \pm \text{SD}$) von Bodenschichten (als Säulen dargestellt) nach dem 1. Tag (A), nach dem 4. Tag (B), nach dem 8. Tag (C) und nach dem 11. Tag (D) der Drainage eines unbepflanzten Bodens. Der Wassergehalt (■) wurde für jede Schicht bestimmt und zeigt Mittelwerte von $n = 4 \pm \text{SD}$.

E.3.3 Bepflanzte Reismikrokosmen

E.3.3.1 Methanemission während der Drainage

Die Methanmessung während der Drainage von Mikrokosmen mit zwei unterschiedlichen Böden zeigte, daß mit Start der Drainage die Methanemission aus den Mikrokosmen innerhalb der ersten 7 Tage sehr stark von 10000 und 17000 $\mu\text{mol h}^{-1} \text{m}^{-2}$ auf unter 10 $\mu\text{mol h}^{-1} \text{m}^{-2}$ abgenommen hatte (Abb. E.3.8). Der sandige Boden wies auch am 34. Tag noch eine geringe Methanemission mit 0,25 $\mu\text{mol h}^{-1} \text{m}^{-2}$ auf, während im lehmigen Boden am 27. Tag nach Start der Drainage weder eine Emission noch eine Aufnahme von atmosphärischem Methan (Abb. E.3.8) detektiert werden konnte.

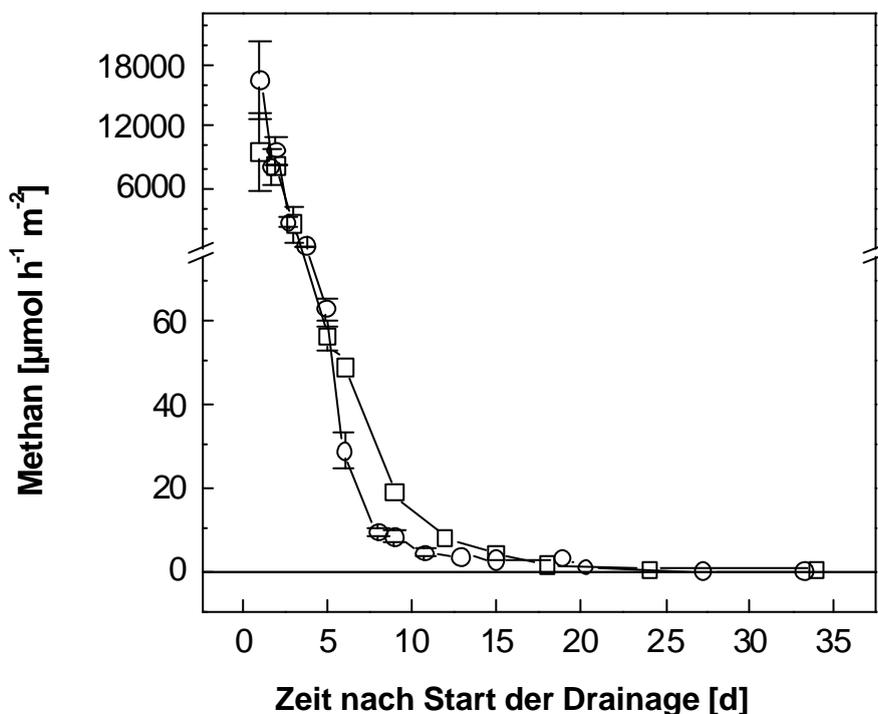


Abb. E.3.8: Methanemissionen von bepflanzt Mikrokosmen von einem lehmigen (○) und einem sandigen Boden (□) während der Drainage. Die Werte mit Fehlerbalken entsprechen Mittelwerten von zwei Parallelen; ohne Fehlerbalken entsprechen sie einer Einzelmessung.

E.3.3.2 Methankonzentrationen unterschiedlicher Bodenschichten

Die Untersuchung von der Methanaufnahme einzelner Bodenschichten zu Zeitpunkten, wo keine bzw. nur noch geringe Methanemissionen detektierbar waren, sollte Hinweise darüber geben, ob lokale Bereiche noch als Senke für atmosphärisches Methan fungieren können.

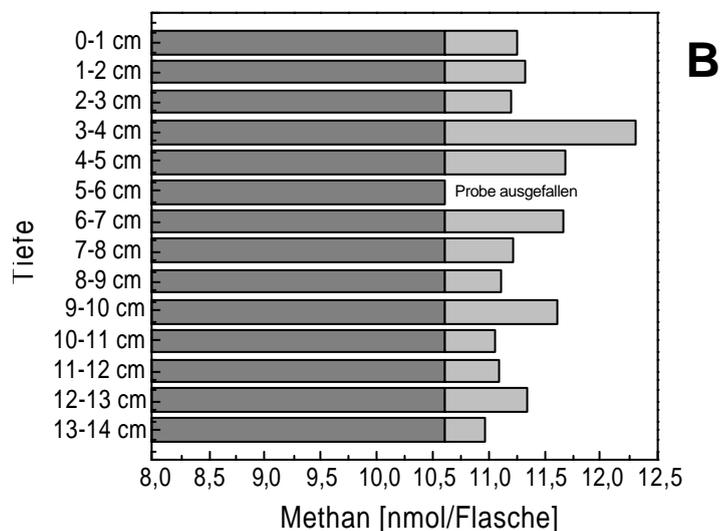
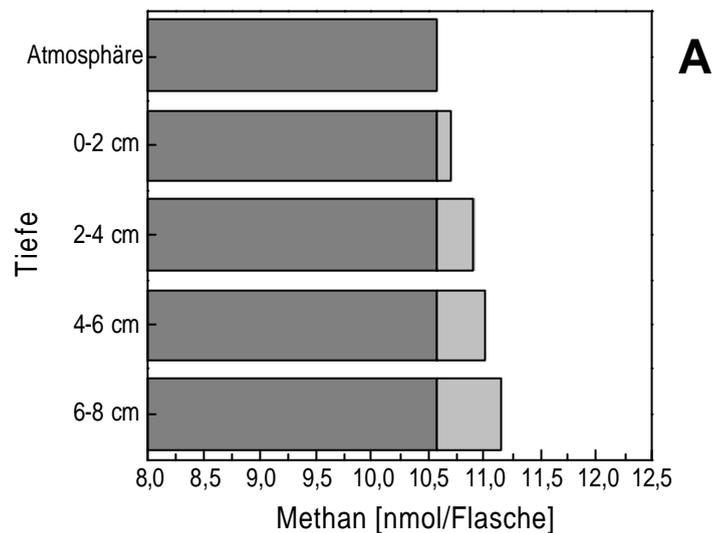
Nach dem Transfer einzelner Bodenschichten in die Inkubationsgefäße kam es zu einer Erhöhung der Methankonzentration in den Gefäßen. Die anschließende dreitägige Inkubation zeigte keine Veränderung der Methankonzentration.

Die Bodenschichten des lehmigen Bodens erhöhten die vorhandenen Methankonzentrationen in den Flaschen mit zunehmender Tiefe bis zu $0,5 \text{ nmol pro gTB}^{-1}$ (Abb. E.3.9A). Die Schichten des sandigen Bodenkerns erhöhten ebenfalls die Methankonzentrationen in den Flaschen. Diese waren jedoch mit bis zu 2 nmol g-TB^{-1} über die Tiefe schwankend (Abb. E.3.9B).

Abb. E.3.9: Methankonzentrationen von lehmigem (A) und sandigem Boden (B), der 27 Tage nach der Drainage in Müller & Krempel Flaschen transferiert wurde.

Der **schwarze** Balken repräsentiert die in der Flasche vorhandene atmosphärische Methankonzentration und der **graue** Balken die Methanmenge, die durch ein Gramm Boden zusätzlich hinzugefügt wurde.

Die Werte sind Mittelwerte von 4fach Messungen einer Schicht.



E.4 Diskussion

Nach dem Beginn der Drainage nahm die Methanemission aus bepflanzten Reismikrokosmen deutlich ab. Ein Wechsel von einer Quelle für Methan zu einer Senke für atmosphärisches Methan durch die Drainage konnte jedoch nicht beobachtet werden (Abb. E.3.8). Diese Beobachtungen stimmen mit solchen aus Feldmessungen überein, die zeigen daß der Reisfeldboden aus Vercelli auch nach der Drainage am Ende der Saison Methan emittiert (Butterbach-Bahl, persönliche Mitteilung). Regenbewässerte Reisfelder in Indien wurden hingegen, ausgenommen während der Wassersättigung, als eine Senke für atmosphärisches Methan erkannt (Singh et al., 1998a). Genauso wie beim jährlichen Fruchtwechsel von geflutetem Reisanbau zur Weizenkultivierung ein Wechsel von Quelle zur Nettosenke für atmosphärisches Methan nach der Drainage festzustellen ist (Singh et al., 1996; 1998b). Ähnliche Wechsel wurden auch für andere periodisch feuchte Wald-, Gras- und Ackerböden berichtet (Harris et al., 1982; Yavitt et al., 1995; Wang und Bettany, 1995; Ambus und Christensen, 1995; Silver et al., 1999; Wickland et al., 1999).

Bei der Oxidation von atmosphärischem Methan scheint die Diffusionslimitierung ein wichtiger Faktor an den unterschiedlichsten Standorten darzustellen (Dörr et al., 1993, Ball et al., 1997) und wurde deshalb mit folgenden Experimenten auch mit Reisfeldboden gezielt untersucht.

In Laborexperimenten konnte beobachtet werden, daß der untersuchte Reisfeldboden unter definierten Bedingungen atmosphärisches Methan oxidieren kann, obwohl dieses Potential für Mikrokosmen nicht gezeigt werden konnte (s.o.). Diese Fähigkeit war zum einen durch die Inkubation von kleinen Bodenaggregaten (2 mm, Durchmesser) unter einer 20%igen Methan-Raumluftatmosphäre induzierbar (Abb. E.3.2A) und konnte zum anderen durch die Flutung von unbepflanzten Reismikrokosmen in den oberen Bodenschichten induziert und nach deren Transfer in Inkubationsflaschen nachgewiesen werden (Abb. E.3.7A-C). An der Luft getrockneter Reisfeldboden zeigte hingegen auch nach Wiederbefeuchtung kein Potential, atmosphärisches Methan zu oxidieren (Bender und Conrad, 1992).

Der Zusatz von Quarzsand zum Boden vor dessen Inkubation in einer Methanatmosphäre führte zu einer dreifach gesteigerten Oxidation von atmosphärischem Methan (Abb. E.3.4). Der Zusatz von Quarzsand zum Boden nach dessen Inkubation führte ebenfalls zur Verdopplung der atmosphärischen Methanoxidation. Diese Beobachtung kann auf die erleichterte Diffusion von Sauerstoff und Methan im Boden mit grober Textur zurückgeführt werden. So zeigten z.B. auch Böden mit einem

natürlicherweise höheren Sandgehalt höhere Aufnahmeraten für atmosphärisches Methan (Dörr et al., 1993).

Im Gegensatz zur Steigerung der Methanoxidation durch Sandzusatz (s.o.) wurde ein Wechsel von einer Nettosenke für atmosphärisches Methan zu einer Methanquelle beobachtet, nachdem die Bodenaggregate vergrößert wurden (Abb. E.3.2). Da Sauerstoff z.B. in gefluteten Reismikrokosmen nur bis zu einer Tiefe von 2-3 mm eindringt (Gilbert und Frenzel., 1995; Ratering und Schnell, 2000), wird mit steigender Aggregatgröße der anoxische Bereich in den Aggregaten vergrößert und damit das Verhältnis von oxischem Boden zu anoxischem Boden verkleinert. Dies schlug sich in der verminderten Sauerstoff- und Methanaufnahme mit steigender Aggregatgröße nieder (Tab. E.3.1, Ansatz B) und führte in Bodenaggregaten ab 8 mm Durchmesser zu einer Methanemission. Da dieser Wechsel zur Methanquelle schon bei kleinen Bodenaggregaten beobachtet werden konnte scheint es auch nicht verwunderlich, im Mikrokosmos und Feld keine Nettosenke für Methan zu beobachten. Die Bodenaggregate im Reisfeld sind deutlich größer. Methanogene Aktivität scheint sogar in Bodenaggregaten von 2 mm Durchmesser vorhanden zu sein. Dies wurde gezeigt, indem die methanogene Aktivität durch den Zusatz von Eisenoxid gehemmt wurde. Eine verstärkte Oxidation von atmosphärischem Methan wurde im Boden mit Eisen(III) beobachtet (Abb. E.3.5A). Diese höhere Aufnahme ist aber vermutlich nicht auf eine stärkere methanotrophe Aktivität zurückzuführen, sondern auf die geringere Methanproduktion in den Ansätzen mit Eisen(III) (Abb. E.3.5B). Die Hemmung der Methanogenen durch Eisen(III) ist wahrscheinlich auf Substratkompetition von Eisenreduzierern mit den Methanogenen zurückzuführen. Da diese vermutlich nur unter anoxischen Bedingungen stattfindet, kann man daraus schließen, daß auch in kleinen Aggregaten anoxische Mikronischen vorhanden sind.

Selbst in bepflanzten Mikrokosmen mit einem erhöhten Sandgehalt, wo die Diffusionslimitierung natürlicherweise vermindert sein sollte (Abb. E.3.8), als auch in unbepflanzten Mikrokosmen mit Zusatz von Quarzsand, kam es nicht zur Oxidation von atmosphärischem Methan (Abb. E.3.6 B und C). Somit scheint die Diffusionslimitierung nicht der einzige Faktor zu sein, der ein Umschalten von einer Methanquelle zur Nettosenke für atmosphärisches Methan verhindert.

Die Experimente zeigen weiterhin, daß die methanotrophe Aktivität im untersuchten Reisfeldboden empfindlicher gegen Austrocknung ist als die methanogene Aktivität. Das Abtrocknen von oxisch

inkubiertem Boden, der das Potential zur Oxidation von atmosphärischem Methan zeigt, führte dazu, daß unterhalb von 20% Wasserhaltekapazität der Boden einem Wechsel von Methansenke zur Methanquelle vollzog (Abb. E.3.1 A). Bei einem Wassergehalt des Bodens, bei dem keine Methanoxidation detektiert werden konnte, war unter anoxischen Bedingungen jedoch methanogene Aktivität detektierbar. Dies zeigt die geringere Empfindlichkeit der Methanogenen gegenüber Wasserstreß. Ähnliche Beobachtungen konnten auch bei Messungen der potentiellen Methanoxidation und -produktion gemacht werden. Nach 11 Tagen Drainage zeigten die Messungen, daß das Potential atmosphärisches Methan zu oxidieren in keiner Schicht mehr detektierbar war (Abb. E.3.7D), obwohl es zu früheren Zeitpunkten während Drainage bis in eine Tiefe von 8 mm vorhanden war (Abb. E.3.7A-C). Der Wassergehalt des Bodens war nach 11 Tagen ebenfalls unterhalb von 20% der Wasserhaltekapazität und die potentielle Fähigkeit zur Methanproduktion war noch in allen Bodentiefen vorhanden (Abb. E.3.7D).

Frühere Untersuchungen zeigten ebenfalls eine Inaktivierung der methanotrophen Bakterien durch einen niedrigen Wassergehalt (Schnell und King, 1996; LeMer et al., 1996; Gullledge und Schimel, 1998). Eine irreversible Hemmung der methanotrophen Aktivität wurde im Boden nach dessen Trocknung beobachtet (Nesbit und Breitenbeck, 1992; Schnell und King, 1996). Eine schnelle Regeneration der methanotrophen Aktivität nach dem Wasserstreß war offensichtlich nicht möglich. Im Gegensatz hierzu wurde sowohl für die Methanproduktion als auch für das Überleben der methanogenen eine relative Unempfindlichkeit gegenüber der Austrocknung und der Sauerstoffanwesenheit gezeigt (Fetzer et al., 1993; Joulain et al., 1996; Ueki et al., 1997). Daher vermutlich auch die Beobachtung niedriger Methanproduktion im drainierten Boden zu einem Zeitpunkt, an dem keine atmosphärische Methanoxidation mehr vorhanden ist.

Regenbewässerte Reisfelder, Waldböden, Gras- und Ackerböden sind charakterisiert durch niedrige Methanproduktion und relativ kurze wassergesättigte oder -überstaute Perioden. Die Methanotrophen in diesen Böden sind an niedrige Methankonzentrationen adaptiert, da sie nur kurzzeitig hohen Methankonzentrationen ausgesetzt sind. Innerhalb der gefluteten Reisfelder hingegen ist die Methanproduktion relativ hoch und die Methanotrophen sind an die dort vorhandenen hohen Methankonzentrationen angepasst.

Das Ergebnis, daß Reisfeldboden auch nach Abtrocknung nicht zur Methansenke wird, legt die Vermutung nahe, daß eine andere Zusammensetzung der methanotrophen Population beider Böden vorhanden ist. Im italienischen Reisfeldboden setzt sie sich phylogenetisch aus Organismen der Typ I und den Typ II Methanotrophen zusammen. Dies geht aus Untersuchung von Genen der partikulären Methanmonooxygenase und Methanoldehydrogenase, sowie der 16S rRNA Analyse hervor (Henckel et al., 1999). Für die beobachtete Oxidation atmosphärischen Methans im untersuchten Reisboden könnten Typ II Methanotrophe verantwortlich sein, da Vertreter dieser Gruppe eine charakteristische Kinetik für atmosphärische Methanoxidation zeigten (Dunfield et al., 1999) und diese generell im Boden gefunden werden. Typ I Methanotrophe werden im Reisfeldboden erst unter speziellen Bedingungen und an speziellen Orten sichtbar, wie z.B. in der Reiserhizosphäre und nach Stickstoffdüngung des Reisfeldboden (Bodelier et al., 2000; Horz et al., 2001; Eller und Frenzel, 2001). In anderen Böden wurde eine komplett unterschiedlich Gemeinschaft gefunden. So findet man z.B. Methanotrophe die zum Genus *Methylocella* zählen in saurem Torfboden. Dieser Genus war bisher noch nicht als Methanverwerter bekannt (Dedysh et al., 1998a;b). In Waldböden zeigen die dominierenden Populationen Gene der Methanmonooxygenase, die verschieden von denen sind, die bisher beschrieben wurden (Holmes et al., 1999; Roslev et al., 1999; Henckel et al., 2000).

Einen deutlichen Effekt auf die Entwicklung von Typ I Methanotrophen konnte während der Drainage von unbepflanzten Mikrokosmen beobachtet werden (Henckel et al., 2000). Hierbei wurde 8 Tage nach Beginn der Drainage die Entwicklung einer großen Diversität von Typ I Methanotrophen über eine Tiefe von 0 bis 20 mm detektiert, während Typ I Methanotrophe am ersten Tag nach Beginn nur innerhalb der ersten 4 mm detektiert werden konnten (Henckel et al., 2000). Dies könnte nicht nur mit dem höheren Sauerstoffeintrag und der damit verbundenen Sauerstoffverfügbarkeit im Boden zusammenhängen, sondern auch mit der Erhöhung der Ammoniumverfügbarkeit durch chemische und biologische Oxidation von Fe^{2+} . Ammonium liegt sowohl frei in der Bodenlösung als auch immobilisiert in Tonmineralen vor. Nach der Flutung steigt der Gehalt des immobilisierten Ammonium an (Keerthisinghe et al., 1984; Stucki et al., 1984; Chen et al., 1987). In der Reiserhizosphäre kommt es jedoch zu einer Mobilisierung des Ammoniums mit steigendem Redoxpotential im Rhizosphärenboden. Diese Mobilisierung nimmt mit steigender Entfernung von der Wurzel ab (Schneiders und Scherer, 1998). Hierbei wurde die Hypothese aufgegriffen, daß die Oxidation von Fe^{2+} zu Fe^{3+} innerhalb von Tonmineralen zur Vergrößerung der positiven Ladung in den Mineralen

führt und dies die Freisetzung von Ammonium bewirken könnte. Andererseits spielen auch Eisenoxide bei der Ammoniumimmobilisierung durch Tonminerale eine wichtige Rolle. So wurde durch das Entfernen von Eisenoxiden aus Böden eine verstärkte Ammoniumimmobilisierung nach Ammoniumgabe beobachtet, während der Zusatz von Eisenoxiden eine Immobilisierung herabsetzte (Scherer und Zhang, 1999). Die Adsorption von Eisenoxiden um die Tonminerale verhindert hier vermutlich das Eindringen und somit die Immobilisierung des Ammoniums. Überträgt man diese Beobachtungen, so kommt man auf folgenden Schlußfolgerung: Mit der Drainage gelangt Sauerstoff in den Boden. Dies führt zur Oxidation von Fe^{2+} in den Tonmineralen und zur Eisenoxidbildung in der Bodenlösung. Aufgrund der oben genannten Beobachtungen muß man annehmen, daß in den Tonmineralien immobilisiertes Ammonium durch die Fe^{2+} -Oxidation freigesetzt werden kann und das an der Oberfläche, durch Mineralisierung, freiwerdendes Ammonium durch höhere Eisenoxidkonzentrationen nicht bzw. weniger immobilisiert wird.

Beide Prozesse haben eine erhöhte Stickstoffverfügbarkeit in Bereichen mit höherem Redoxpotential zur Folge. Eine Stickstofflimitierung für Methanotrophe im Reisfeldboden (Bodelier et al., 2000b; Eller und Frenzel, 2001) könnte hierbei aufgehoben werden und würde einen Zusammenhang für die rasche Entwicklung von Typ I Methanotrophen nach Ammoniumdüngung und nach der Drainage liefern, bzw. die Lokalisierung der Typ I Methanotrophen im Wurzelbereich erklären

F. Allgemeine Schlußbetrachtung

Der Abbau organischer Verbindungen wird nach dem Verbrauch von Sauerstoff im Reisfeldboden durch verschiedene anaerobe Prozesse mikrobiell katalysiert. Abb.F1(A): Polymere wie Zellulose, Stärke, Pektin, Proteine, Lipide und Nukleoside werden durch extrazelluläre Enzyme von fakultativ anaeroben und obligat anaeroben Bakterien hydrolysiert und in die entsprechenden Monomere wie Zucker, Aminosäuren, Fettsäuren und Nukleinsäuren gespalten. Diese werden von gärenden Bakterien als auch von Bakterien, die Nitrat, Mangan(IV), Eisen(III), Sulfat und Kohlendioxid anstelle von Sauerstoff als terminaler Elektronenakzeptor verwenden, als Substrat genutzt. Unter bestimmten Bedingungen kann eine sequentielle Reduktion der alternativen Elektronenakzeptoren mit folgender Reihenfolge beobachtet werden: Nitratreduktion, Manganreduktion, Eisenreduktion, Sulfatreduktion und anschließend Methanogenese. Eine Erklärung dieser Beobachtung könnte der Energiegewinn bei den verschiedenen Redoxprozessen sein, der mit der angegebenen Reihenfolge abnimmt (thermodynamische Theorie, Ponnampuram, 1972; Zehnder und Stumm, 1988) und dies z.B. den Nitratreduzierern erlaubt, niedrigere Substratkonzentrationen zu nutzen. Dieses hat zur Folge, daß die Konzentration der Substrate während der Nitratreduktion so weit abgesenkt werden, daß deren Verwertung durch die anderen beschriebenen Organismengruppen thermodynamisch so lange unmöglich ist, bis Nitrat als Elektronenakzeptor vollkommen verbraucht ist. Erst in den letzten Jahren wurde im kontrolliert gefluteten Reisfeldern die Bedeutung der eisenreduzierenden Bakterien am anaeroben Abbau von organischem Material untersucht (Yao und Conrad, 1999; Jäckel und Schnell, 2000). Hierbei stellte sich heraus, daß der an die Eisenreduktion gekoppelte anaerobe Abbau organischen Materials nach der Methanogenese der wichtigste Prozeß ist, der bei hohen Eisen(III)konzentrationen sogar dominieren kann (Jäckel und Schnell, 2000). Aufgrund der hohen Aktivität der eisenreduzierenden Bakterien im Reisfeldboden bewirkt eine Eisen(III)düngung eine Stimulation der Eisenreduktion und somit einen veränderten Elektronenfluß im Boden (Abb. F.1(B)). Die Konkurrenz um Substrate wie Wasserstoff und Acetat mit den Methanogenen führt hier zu einer verminderten Methanproduktion und stellt somit eine Möglichkeit dar, die Methanemission aus den gefluteten Reisfeldern zu vermindern.

Oxische Böden sind als biogenen Nettosenken für atmosphärisches Methan bekannt (Abb.F.1 (D)). Sie besitzen eine geschätzte globale Aufnahmekapazität von ca. 30-40 Tg Methane pro Jahr (Dörr et al., 1993; Smith et al., 2000). Zu diesen Böden zählt z.B. auch der von uns untersuchte Waldboden. Der Anstieg der CH₄ Konzentration kann sowohl auf eine verstärkte Produktion als auch eine Verminderung der Senken zurückgeführt werden. Die Veränderung von Bodenparametern durch anthropogene Aktivitäten hat einen starken Einfluß auf die Senkenstärke für atmosphärisches Methan. In vielen Feldstudien wurde gezeigt, daß z.B. die Ammoniumdüngung eine Hemmung der methanotrophen Aktivität im Boden bewirkt (z.B. Steudler et al 1989, Mosier et al. 1991, Hütsch et al. 1993). Dies konnte sowohl auf eine Konkurrenz von Ammonium mit Methan an der Methanmonooxygenase als auch auf die toxische Wirkung des entstehenden Zwischenproduktes Nitrit bei der Ammoniumoxidation zurückgeführt werden (King und Schnell, 1994). Der Einsatz von Herbiziden, Insektiziden und Pestiziden (Topp, 1993; Boeckx et al., 1998) hat ebenfalls eine verminderte Methanoxidation in Böden zur Folge, genauso wie die stärkere mechanische Beanspruchung eines Bodens zur deutlich verminderten Methanaufnahmekapazität führt (Hütsch et al. 1994; Hütsch, 1998). Prinzipiell kann man also davon ausgehen, daß mit einer intensiven Bodenbearbeitung die Fähigkeit zur Oxidation atmosphärischen Methans vermindert wird und wie durch Willson und Mitarbeiter (1995) beobachtet wurde, eine abnehmende Methanaufnahmekapazität in der Reihenfolge: Waldboden > Wiesenboden > Ackerboden stattfindet. Wir können davon ausgehen, daß Böden vor der Nutzung zum Reisanbau ebenfalls eine Senke für atmosphärisches Methan waren. Insbesondere als Folge der Flutung dieser Böden ist ein Funktionswechsel von einer Methansenke zu einer bedeutenden Methanquelle entstanden, was zu einem Anstieg der atmosphärischen Methankonzentration innerhalb der letzten Jahrhunderte geführt hat. Die Methanoxidation spielt innerhalb der Reisfeldböden eine bedeutende Rolle; so werden bis zu 97% des im Boden gebildeten Methans in den oxisch anoxischen Übergangszonen oxidiert (Abb. F.1. (E)), bevor es in die Atmosphäre gelangt (Conrad und Rothfuss, 1991; Gilbert und Frenzel, 1995; Denier van der Gon und Neue, 1996; Lombardi et al., 1997; Bosse und Frenzel, 1998; Krüger et al., 2000). Warum geflutete Reisfeldböden ohne einen Fruchtwechsel in der flutwasserfreien Periode jedoch kein atmosphärisches Methan aufnehmen (Abb. F1 (D)), ist vermutlich bedingt durch die extremen Veränderungen der Bodenparameter, die mit dem Reisanbau einhergehen. Diese können einen starken Einfluß auf die methanotrophe Bakterien ausüben. Bisher ist es noch nicht sicher, ob die Aufnahme von atmosphärischem Methan in Böden durch eine metabolische Anpassung bekannter methanotropher Bakterien an geringe Methankonzentrationen (Dunfield et al.,

1999; Dunfield und Conrad, 2000), durch die Aktivität neuer, bisher nur mit molekularen Methoden nachgewiesener Bakterien (Henckel et al., 2000) oder durch beide stattfindet. Die Isolierung bisher nur molekular detektierter Bakterien aus dem Waldboden würde hier vermutlich viele neue Erkenntnisse liefern. Ein Verschwinden der im Waldboden molekular detektierten Methanotrophen von Standorten, die plötzlich landwirtschaftlich intensiv genutzt werden wäre denkbar, da diese sehr empfindlich gegenüber äußeren Einflüssen wie Wasserstreß, Ammonium, Monoterpenen (Schnell und King, 1994,1996; Amaral und Knowles, 1998) und nach unserer Untersuchung vermutlich auch durch Methionin oder dessen Abbauprodukte, sowie durch Ethylen gehemmt werden. Eine Regeneration der Methanotrophen scheint generell, wie im Falle der Austrocknung (Nesbit und Breitenbeck, 1992) nur langsam zu sein. Eine vollständige Regeneration der methanotrophen Aktivität dauerte im Falle der Bewaldung einer zuvor landwirtschaftlich genutzten Ackerfläche mehr als 100 Jahre (Priemé et al., 1997).

- Abeles F.B., Morgan P.W. und Saltveit Jr., M.E. (1992)** Ethylene in plant biology. Academic Press, Inc., London
- Achtnich C., Bak F. und Conrad R. (1995a)** Competition for electron donors among nitrate reducers, ferric iron reducers, sulfate reducers, and methanogens in anoxic paddy soil. *Biol. Fertil. Soils* 19:65-72
- Achtnich C., Schuhmann A., Wind T. und Conrad R. (1995b)** Role of interspecies H₂ transfer to sulfate and ferric iron-reducing bacteria in acetate consumption in anoxic paddy soil. *FEMS Microbiology Ecology* 16: 61-69
- Adamsen A.P.S. und G.M. King (1993)** Methane consumption in temperate and subarctic forest soils: rates, vertical zonation, and responses to water and nitrogen. *Applied and Environmental Microbiology* 59: 485-490
- Amaral J.A. und Knowles R. (1997a)** Inhibition of methane consumption in forest soils and pure cultures of methanotrophs by aqueous forest soil extracts. *Soil Biology & Biochemistry* 29: 1713-1720
- Amaral J.A. und Knowles R. (1997b)** Localisation of methane consumption and nitrification activities in some boreal forest soils and the stability of methane consumption on storage and disturbance. *Journal of Geophysical Research* 102: 29.255-29.260
- Amaral J.A. und Knowles R. (1998)** Inhibition of methane consumption in forest soils by monoterpenes. *Journal of Chemical Ecology* 24: 723-734
- Amaral J.A., Ekins A., Richards S.R. und Knowles R. (1998a)** Effect of selected monoterpenes on methane oxidation, denitrification, and aerobic metabolism by bacteria in pure culture. *Applied and Environmental Microbiology* 64: 520-525
- Ambus P. und Christensen S. (1995)** Spatial and seasonal nitrous oxide and methane fluxes in Danish forest-, grassland-, and agroecosystems. *Journal of Environmental Quality* 24: 993-1001
- Ando T., Yoshida S. und Nishiyama I. (1983)** Nature of oxidizing power of rice roots. *Plant and Soil* 72: 57-71
- Armstrong W. (1967)** The oxidizing activity of roots in waterlogged soils. *Physiologia Plantarum* 20: 920-926
- Armstrong W. (1971)** Radial oxygen losses from intact rice roots as affected by distance from the apex, respiration and waterlogging. *Physiol. Plant.* 25: 192-197

- Armstrong W. (1979)** Aeration in higher plants. *Advances in Botanical Research* 7: 225-332
- Armstrong W. (1991)** Root adaptation to soil waterlogging. *Aquatic Botany* 39: 57-73
- Asada K. und Takahashi M. (1987)** Production and scavenging of active oxygen in photosynthesis. In: *Photoinhibition*. Kyle D.J., Osmond C.B. und Arntzen C.J. (eds.) Elsevier Science Publishers. Amsterdam: 227-287
- Aylmore L.A.G., Karim M. und Quirk J.P. (1967)** Adsorption and desorption of sulfate ions by soil constituents. *Soil Science* 103: 10-15
- Bacha R.E. und Hossner L.R. (1977)** Characteristics of coatings formed on rice roots as affected by iron and manganese additions. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 41: 931-935
- Bak F., Scheff G. und Jansen K.-H. (1991)** A rapid and sensitive ion chromatographic technique for the determination of sulfate and sulfite reduction rates in freshwater lake sediments. *FEMS Microbiology Ecology*. 85: 23-30
- Ball B.C., Smith K.A., Klemetsson L., Brumme R., Sitaula B.K., Hansen S., Prieme A., MacDonald J. und Horgan G.W. (1997)** The influence of soil gas transport properties on methane oxidation in a selection of northern European soils. *Journal of Geophysical Research* 102: 23309-23317
- Bandyopadhyay T.K., Goyal P. und Singh P. (1996)** Generation of methane from paddy fields and cattle in India, and its reduction at source. *Atmospheric Environment* 30: 2569-2574
- Banker B.C., Kudze H.K., Alford D.P., DeLaune R.D. und Lindau C.W. (1995)** Methane sources and sinks in paddy rice soil: relationship to emission. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 53: 243-251
- Barber D.A., Ebert M. und Evans N.T.S. (1962)** The movement of ^{15}O through barley and rice plants. *J. Exper. Bot.* 13: 397-403
- Bayan M.R. und Eivazi F. (1999)** Selected enzyme activities as affected by free iron oxides and clay particle size. *Commun. Soil. Sci. Plant Anal.* 30: 1561-1571
- Beavis J. und Mott C.J.B. (1996)** Effects of land use on the amino acid composition of soils: 1. Manured and unmanured soils from the broadbalk continuous wheat experiment, Rothamsted, England. *Geoderma* 72: 259-270
- Bedard C. und Knowles R. (1989)** Physiology, biochemistry and specific inhibitors of CH_4 , NH_4^+ and CO oxidation by methanotrophs and nitrifiers. *Microb. Reviews* 53: 68-84

- Begg C.B.M., Kirk G.J.D., Mackenzie A.F. und Neue H.-U. (1994)** Root-induced iron oxidation and pH changes in the lowland rice rhizosphere. *New Phytol.* 128: 469-477
- Bell P.E., Mills A.L. und Herman J.S. (1987)** Biogeochemical conditions favoring magnetite formation during iron reduction. *Applied and Environmental Microbiology* 53: 2610-2616
- Benckiser G., Ottow J.C.G., Watanabe I. und Santiago S. (1984)** The mechanism of excessive iron uptake (iron toxicity) of wetland rice. *Journal of Plant Nutrition* 7: 177-185
- Bender M. und Conrad R. (1992)** Kinetics of CH₄ oxidation in oxic soils exposed to ambient air or high CH₄ mixing ratios. *FEMS Microbiology Ecology* 101: 261-270
- Bender M. und Conrad R. (1993)** Kinetics of CH₄ oxidation in oxic soils. *Chemosphere* 26: 687-696
- Bender M. und Conrad R. (1995)** Effect of CH₄ concentrations and soil conditions on the induction of CH₄ oxidation activity. *Soil Biology & Biochemistry* 27: 1517-1527
- Berekaa M.M. und Steinbüchel A. (2000)** Microbial degradation of the multiply branched alkane 1,2,10,15,19,13-hexamethyltetracosane (Squalene) by *Mycobacterium fortuitum* and *Mycobacterium ratisbonense*. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 4462-4467
- Blake D.R. und Rowland F.S. (1988)** Continuing world wide increase in tropospheric methane, 1978 to 1987. *Science* 239: 1129-1131
- Bode K., Döring O., Lüthje S., Neue H.-U. und Böttger M. (1995)** The role of active oxygen in iron tolerance of rice (*Oryza sativa* L.). *Protoplasma* 184: 249-255
- Bodelier P.L.E. und Frenzel P. (1999)** Contribution of methanotrophic and nitrifying bacteria to CH₄ and NH₄⁺ oxidation in the rhizosphere of rice plants as determined by new methods of discrimination. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 1826-1833
- Bodelier P.L.E., Roslev P., Henckel T. und Frenzel P. (2000)** Stimulation by ammonium-based fertilizers of methane oxidation in soil around rice roots. *Nature* 403: 421-424
- Bodrossy L., Kovacs K.L., McDonald I.R. und Murrel J.C. (1999)** A novel thermophilic methane-oxidising *γ-Proteobacterium*. *FEMS Microbiology Letters* 170: 335-341
- Boeckx P., van Cleemput O. und Meyer T. (1998)** The influence of land use and pesticides on methane oxidation in some Belgian soils. *Biology and Fertility of Soils.* 27: 293-298
- Born M., Dörr H. und Levin I. (1990)** Methane consumption in aerated soils of the temperate zone. *Tellus* 42B: 2-8

- Bosse U. und Frenzel P. (1997)** Activity and distribution of methane-oxidizing bacteria in flooded rice soil microcosms and in rice plants (*Oryza sativa*). *Applied and Environmental Microbiology* (63) 4: 1199-1207
- Bosse U. und Frenzel P. (1998)** Methane emission from rice microcosms: The balance of production, accumulation and oxidation. *Biogeochemistry* 41: 199-214
- Brusseau G.A., Tsien H.C., Hanson R.S. und Wackett L.P. (1990)** Optimization of trichloroethylene oxidation by methanotrophs and use of a colorimetric assay to detect soluble methane monooxygenase activity. *Biodegradation* 1: 19-29
- Buendica L.V., Neue H.-U., Wassmann R., Lantin R.S. und Javellana A.M. (1997)** Understanding the nature of methane emission from rice ecosystems as basis of mitigation strategies. *Applied Energy* 56: 433-444
- Butterbach-Bahl K., Gasche R., Huber CH., Kreutzer K. und Papen H. (1998)** Impact of N-input by wet deposition on N-trace gas fluxes and CH₄-oxidation in spruce forest ecosystems of the temperate zone in Europe. *Atmospheric Environment* 32: 559-564
- Carlsen H.N., Joergensen L. und Degn H. (1991)** Inhibition by ammonia of methane utilization in *Methylococcus capsulatus* (Bath). *Applied and Environmental Biotechnology* 35: 124-127
- Chan A.S.K. und Parkin T.B. (2000)** Evaluation of potential inhibitors of methanogenesis and methane oxidation in al landfill cover soil. *Soil Biology and Biochemistry* 32: 1581-1590
- Chen C.C., Dixon J.B. und Turner F.T. (1980)** Iron coatings on rice roots: Mineralogy and quality influencing factors. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 44: 635-638
- Chen R., Zhang J., Guo W. und Chen W. (1987)** N fertilizer (urea) topdressed on unsaturated soil and deep-placed using reflooding water. *International Rice Research Newsletter* 12: 35-36
- Childs C.W. (1992)** Ferrihydrite: A review of structure, properties and occurrence in relation to soils. *Z. Pflanzenernähr. Bodenk.* 155: 441-448
- Cicerone R.J. und Oremland R.S. (1988)** Biogeochemical aspects of atmospheric methane. *Global Biogeochemical Cycles* 2: 299-327
- Conrad R. und Rothfuß F. (1991)** Methane oxidation in the soil surface layer of a flooded rice field and the effect of ammonium. *Biology and Fertility of Soils* 12: 28-32
- Courtney K.J., Ward B.B. und Langenheim J.H. (1991)** The effect of coastal redwood monoterpenes on *Nitrosomonas europaea*. *Am. J. Bot. Suppl.* 78: 144-145

- Craig H., Chou C.C., Welhan J.A., Stevens C.M. und Engelkemeir A. (1988)** The isotopic composition of methane in polar ice cores. *Science* 242: 1535-1538
- Crill P.M. (1991)** Seasonal patterns of methane uptake and carbon dioxide release by a temperate woodland soil. *Global Biogeochemical Cycles* 5: 319-334
- Crutzen P.J. (1991)** Methane's sinks and sources. *Nature* 350: 380-381
- Crutzen P.J. (1995)** The role of methane in atmospheric chemistry and climate. In: von Engelhardt, W., Leonhardt-Marek, S., Breves, G., Giesecke, D. (eds.), *Ruminant Physiology, Digestion, Metabolism, Growth and Reproduction*. Enke, Stuttgart: 291-315
- Czepiel P.M., Crill P.M. und Harris R.C. (1995)** Environmental factors influencing the variability of methane oxidation in temperate zone soils. *Journal of Geophysical Research* 100: 9359-9364
- De Bont J.A.M. (1976)** Oxidation of ethylene by soil bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 1&2: 59-71
- Dedysh S.N., Panikov N.S., Liesack W., Großkopf R., Zhou J.Z. und Tiedje J.M. (1998a)** Isolation of acidophilic methane-oxidizing bacteria from northern peat wetlands. *Science* 282: 281-284
- Dedysh S.N., Panikov N.S. und Tiedje J.M. (1998b)** Acidophilic methanotrophic communities from *Sphagnum* peat bogs. *Applied and Environmental Microbiology* 64: 922-929
- Denier van der Gon H.A.C. (2000)** Changes in CH₄ emission from rice fields from 1960 to 1990s 1. Impacts of modern rice technology. *Global Biogeochemical Cycles* 1: 61-72
- Denier van der Gon H.A.C. und Neue H.-U. (1996)** Oxidation of methane in the rhizosphere of rice plants. *Biology and Fertility of Soils* 22: 359-366
- Dias B. und Weimer B. (1998a)** Conversion of methionine to thiols by *lactococci*, *lactobacille*, and *Brevibacteria*. *Applied and Environmental Microbiology* 64: 3320-3326
- Dias B. und Weimer B. (1998b)** Purification and characterisation of L-methionine γ -Lyase from *Brevibacterium linens* BL2. *Applied and Environmental Microbiology* 64: 3327-3331
- Dlugokencky E.J., Masarie K.A., Lang P.M. und Tans P.P. (1998)** Continuing decline in the growth rate of the atmospheric CH₄ burden. *Nature* 393: 447-450
- Dobbie K.E. und Smith K.A. (1996)** Comparison of CH₄ oxidation rates in woodland, arable and set aside soils. *Soil Biology & Biochemistry* 28: 1357-1365

- Dong H., Fredrickson J.K., Kennedy D.W., Zachara J.M., Kukkadapu R.K. und Onstott T.C. (2000)** Mineral transformation associated with the microbial reduction of magnetite. *Chemical Geology* 169: 299-318
- Dörr H., Katruff L. und Levin I. (1993)** Soil texture parameterization of the methane uptake in aerated soils. *Chemosphere* 26: 697-713
- Dowdel R.J., Smith K.A., Crees R. und Restall W.F. (1972)** Field studies of ethylene in the soil atmosphere-equipment and preliminary results. *Soil Biology & Biochemistry* 4:325-331
- Dunfield P. und Knowles R. (1995)** Kinetics of inhibition of methane oxidation by nitrate, nitrite, and ammonium in a humisol. *Applied and Environmental Microbiology* 61: 3129-3135
- Dunfield P.F., Liesack W., Henckel T., Knowles R. und Conrad R. (1999)** High-affinity methane oxidation by a soil enrichment culture containing a type II methanotroph. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 1009-1014
- Dunfield P.F. und Conrad R. (2000)** Starvation alters the apparent half-saturation constant for methane in the type II methanotroph *Methylocystis* Strain LR1. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 4136-4138
- Eller G. und Frenzel P. (2001)** Changes in activity and community structure of methane oxidizing bacteria over the vegetation period of rice. Eingereicht zur Veröffentlichung
- Elsgaard L. (2001)** Ethylene turn-over in soil, litter and sediment. *Soil Biology & Biochemistry* 33: 249-252
- Erda L., Yue L. und Hongmin D. (1997)** Potential GHG mitigation options for agriculture in China. *Applied Energy* 56: 423-432
- Fageria N.K. and Tabela N.A. (1987)** Tolerance of rice cultivars to iron toxicity. *Journal of Plant Nutrition*: 653-661
- Farmer V.J. und Wilson M.J. (1970)** Experimental conversion of biotite to hydrobiotite. *Nature* 226: 841-842
- Fetzer S., Bak F. und Conrad R. (1993)** Sensitivity of methanogenic bacteria from paddy soil to oxygen and desiccation. *FEMS Microbiology Ecology* 12: 107-115
- Fitzgerald J.W., Andrew T.L. und Swank W.T. (1984)** Availability of carbon-bonded sulfur for mineralization in forest soils. *Canadian Journal of Forest Research* 14: 839-843
- Frankel R.B., Blakemore R.B. und Wolfe R.S. (1979)** Magnetite in freshwater magnetotactic bacteria. *Science* 203: 1355-1356

- Frankenberger Jr. W.T. and Arshad M. (1995)** Phytohormones in soils. In: Microbial production and function. Dekker. New York: 351-435
- Frenzel P., Rothfuß F. und Conrad R. (1992)** Oxygen profiles and methane turnover in a flooded rice microcosm. Biol. Fertil. Soils 14:84-89
- Frenzel P., Bosse U. und Janssen P.H. (1999)** Rice roots and methanogenesis in a paddy soil: ferric iron as an alternative electron acceptor in rooted soil. Soil Biology & Biochemistry 31: 421-430
- Fritsche W. (1998)** Umwelt-Mikrobiologie: Grundlagen und Anwendung. Verlag: Gustav Fischer, Jena
- Fukuda H., Takahashi M., Fujii T., Tazaki Masato und Ogawa T. (1989)** An NADH:Fe(III)EDTA oxidoreduktas from *Cryptococcus albidus*: an enzyme involved in ethylene produktion in vivo?
- Fukuda H. und Ogawa T. (1991)** Microbial ethylene production. In: The plant hormone ethylene . Matoo M.K. und Suttle J.C. (eds.), CRC Press, Boca Taton: 279-314
- Fukuda H., Ogawa T., Tazaki M., Nagahama K., Fujii T., Tanase S. und Morino Y. (1992).** Two reactions are simultaneously catalyzed by a single enzyme: the arginine-dependent simultaneous formation of two products, ethylene and succinate, from 2-oxoglutarate by an enzyme from *Pseudomonas syringae*. Biochemical and Biophysical Research Communications 188: 483-489.
- Fukuda H., Ogawa T. und Tanase S. (1993)** Ethylene production by microorganisms. Advances in Microbial Physiology 35: 275-306
- Gao S., Mooberry E.S. und Steele J.L. (1998)** Use of ¹³C nuclear magnetic resonance and gas chromatography to examine methionine catabolism by lactococci. Applied and Environmental Microbiology 64: 4670-4675
- Gibb-Eggar Z., Jude B., Dominik J., Loizeau J.-L. und Oldfield F. (1999)** Possible evidence for dissimilatory bacterial magnetite domination the magnetic properties of recent lake sediments. Earth and Planetary Science Letters 168: 1-6
- Gilbert B. und Frenzel P. (1995)** Methanotrophic bacteria in the rhizosphere of rice microcosms and their effect on porewater methane concentration and methane emission. Biol. Fertil. Soils 20: 93-100
- Gilbert B. und Frenzel P. (1998)** Rice roots and CH₄ oxidation - the activity of bacteria, their distribution and the microenvironment. Soil Biology & Biochemistry 30: 1903-1916

- Gisi U., Schenker R., Schulin R., Stadelmann F.X. und Hans Sticher (1990)** Bodenökologie. Verlag: Thieme, Stuttgart
- Goodlass G. und Smith K.A. (1978)** Effect of pH, organic matter content and nitrate on the evolution of ethylene from soils. *Soil Biology & Biochemistry* 10: 193-199
- Graedel T.E. und Crutzen P.J. (1994)** Chemie der Atmosphäre: Bedeutung für Klima und Umwelt. Spektrum, Akad. Verl. Heidelberg
- Green M.S. und Etherington J.R. (1977)** Oxidation of ferrous iron by rice (*Oryza sativa* L.) roots: a mechanism for waterlogging tolerance? *J. Experi. Bot.* 28: 678-690
- Gulledge J. und Schimel J.P. (1998)** Moisture control over atmospheric CH₄ consumption and CO₂ production in diverse Alaskan soils. *Soil Biology & Biochemistry* 30: 1127-1132
- Halliwell B. und Gutteridge J.M.C. (1984)** Lipid peroxidation, oxygen radicals, cell damage and antioxidant therapy. *Lacet* 1: 1369
- Halliwell B. und Gutteridge J.M.C. (1989)** Free radicals in biology and medicine. 2nd edn. Oxford University Press, Oxford
- Harris R.C. und Sebacher D.I. (1982)** Methane flux in the Great Dismal Swamp. *Nature* 297: 673-674
- Henckel T., Friedrich, M. und Conrad R. (1999)** Molecular analyses of the methane-oxidizing microbial community in rice field soil by targeting the genes of the 16S rRNA, particulate methane monooxygenase, and methanol dehydrogenase. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 1980-1990
- Henckel T., Jäckel U., Schnell S. und Conrad R. (2000)** Molecular analysis of novel methanotrophic communities in forest soil oxidizing atmospheric methane. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 1801-1808
- Hendrickson O.Q. (1989)** Implications of natural ethylene cycling processes for forest soil acetylene reduction assays. *Can. J. Microbiol.* 35: 713-718
- Heyer J. (1977)** Results of enrichment experiments of methane-assimilating organisms from exological point of view. In: *Internat. Symp. „Microbial Growth on C₁-Compounds“* Pushchino, Abstracts: 19-21
- Heyer J. (1990)** Der Kreislauf des Methans. *Mikrobiologie/ Ökologie/ Nutzung*. Akademie – Verlag, Berlin

- Heyer J., Malshenko Y., Berger U. und Budkova E. (1984)** Verbreitung methanotropher Bakterien. Zeitschrift für allgemeine Mikrobiologie 24: 725-744
- Holmes A.J., Costello A., Lidstrom M.E. und Murell J.C. (1995)** Evidence that particulate methane monooxygenase and ammonia monooxygenase may be evolutionarily related. FEMS Microbiology Letters 132: 203-208
- Holmes A.J., Roslev P., McDonald I.R., Iversen N., Henriksen K. und Murrell J.C. (1999)** Characterization of methanotrophic bacterial populations in soils showing atmospheric methane uptake. Applied and Environmental Microbiology 65: 3312-3318
- Holzappel-Pschorn A., Conrad R. und Seiler W. (1985)** Production, oxidation and emission of methane in rice paddies. FEMS Microbiology Ecology 31: 343-351
- Horz H.-P., Yinga M.T. und Liesack W.** Molekular analysis of methanotrophs associated with roots of submerged rice plants by targeting functional and phylogenetic genes, including pmoA-based T-RFLP profiling. Eingereicht zur Veröffentlichung
- Horz. H.P. (1997)** Vergleichende molekularbiologische Charakterisierung methanogener Populationen an Wurzeln verschiedener Reisvarietäten. Diplomarbeit, Universität Marburg
- Howler R.H. (1973)** Iron-induced orange disease of rice in relation to physico-chemical changes in a flooded soil. Proceedings of the Soil Science Society of America 37: 898-903
- Hütsch W.B., Webster C.P. und Powlson D.S. (1993)** Long-term effect of nitrogen fertilization on methane oxidation in soil of the broadbalk wheat experiment. Soil Biol. Biochem. 25: 1307-1315
- Hütsch, W.B., C.P. Webster, and D.S. Powlson (1994)** Methane oxidation in soil as affected by land use, soil pH and N fertilization. Soil Biology and Biochemistry 26: 1613-1622
- Hütsch B.W. (1998)** Tillage and land use effects on methane oxidation rates and their vertical profiles. Soil Biology and Fertility. Soils 27 284-292
- Hyman M.R. und Wood P.M. (1984)** Ethylene oxidation by *Nitrosomonas europaea*. Arch. Microbiol. 137: 155-158
- Ilag L. und Curtis R.W. (1968)** Production of ethylene by fungi. Science 159: 1357-1358
- Ince J.E. und Knowles C.J. (1986)** Ethylene formation by cell-free extracts of *Escherichia coli*. Archives of Microbiology 146: 151-158
- Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC) (1994)** Radiative forcing of climate change and evaluation of the IPCC IS92 emission scenarios, Cambridge University Press, New York

- Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC) (1996)** Climate Change 1995: the science of climate change. Houghton J.T., Meira Filho, L.G., Callander B.A., Harris N., Kattenberg, A. und Maskell, K. (eds.).Cambridge University Prss, Cambridge, U.K.
- Inubushi K., Hori K., Matsumoto S. und Wada H. (1997)** Anaerobic decomposition of organic carbon in paddy soil in relation to methane emission to the atmosphere. *Water Science and Technology* 36: 523-530
- Ishizuka S., Skata T. und Ishizuka K. (2000)** Methane oxidation in Japanese forest soil. *Soil Biology and Biochemistry* 32: 769-777
- Iivanainen E.K., Martikainen P.J., Räisänen M.L. und Katila M.-L. (1997)** Mycobacteria in boreal coniferous forest soil. *FEMS Microbiology Ecology* 23: 325-332
- Jäckel U. und Schnell S. (2000)** Role of microbial iron reduction in paddy soil. In: Non-CO₂ greenhouse gases: Scientific understanding, control and implementation. Van Ham J., Baede A.P.M., Meyer L.A. und Ybema R.(eds.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht: 143-144
- Jäckel U. (1997)** Die Bedeutung der mikrobiellen Eisenreduktion im Reisfeldboden. Diplomarbeit. Philipps-Universität-Marburg
- Joulian C., Ollivier B., Neue H.-U. und Roger P.A. (1996)** Microbiological aspects of methane emission by a ricefield soil from the Camargue (France). 1. Methanogenesis and related microflora. *European Journal of Soil Biology* 32: 61-70
- Kandeler E. und Gerber H. (1988)** Short-term assay of soil urease activity using colorimetric determination of ammonium. *Biology and Fertility of Soils*. 6: 68-72
- Kazunga C. und Aitken M.D. (2000)** Products form the incomplete metabolism of pyrene by polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 1917-1922
- Keerthisinghe G., Mengel K. und De Datta S.K. (1984)** The release of nonexchangeable ammonium (15N-labeled) in wetland rice soils. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 48: 291-294
- Kern J.S., Zitong G., Ganlin Z., Huizhen Z. und Guobao L. (1997)** Spatial analysis of methane emissions from paddy soils in China and the potential for emissions reduction. *Nutrient Cycling in Agroecosystems* 49: 181-195
- Kesheng S. und Zhen L. (1997)** Effect of rice cultivars and fertilizer management on methane emission in a rice paddy in Beijing. *Nutrient Cycling in Agroecosystems* 49: 139-146

- Kimura M., Miura Y., Watanabe A., Katoh T. und Haraguche H. (1991)** Methane emission from paddy field (part 1) effect of fertilization, growth stage and midsummer drainage: pot experiment. *Environmental Science* 4: 256-271
- King G.M. (1992)** Ecological aspects of methane oxidation, a key determinant of global methane dynamics. *Advances in Microbial Ecology* 12: 431-468
- King G.M. (1994)** Associations of methanotrophs with the roots and rhizomes of aquatic vegetation. *Applied and Environmental Microbiology* 60: 3220-3227
- King G. M. und Schnell S. (1994)** Effect of increasing atmospheric methane concentration on ammonium inhibition of soil methane consumption. *Nature* 370: 282-284
- Kirk G.J.D. und Bajita J.B. (1995)** Root-induced iron oxidation, pH changes and zinc solubilization in the rhizosphere of lowland rice. *New Phytol.* 131: 129-137
- Klüber H.D. (1996)** Wechselwirkungen zwischen Nitratreduktion und Methanogenese in anoxischen Reisfeldbodenaufschlammungen. Dissertation, Marburg/Lahn
- Klüber H.D. und Conrad R. (1998)** Effects of nitrate, nitrite, NO and N₂O on methanogenesis and other processes in anoxic rice field soil. *FEMS Microbiology and Ecology* 25: 301-318
- Koschorreck M. und Conrad R. (1993)** Oxidation of atmospheric methane in soil: measurements in the field, in soil cores and in soil samples. *Global Biogeochemical Cycles* 7: 109-121
- Koyama T. und Kimura M. (1998)** Inhibitors of methane production in paddy soils. *Soil Science and Plant Nutrition* 44: 667-674
- Krüger M., Frenzel P. und Conrad R. (2000)** Microbial processes influencing methane emission from rice fields. *Global Change Biology* 6: 1-15
- Krumböck M. und Conrad R. (1991)** Metabolism of position-labelled glucose in anoxic methanogenic paddy soil and lake sediment. *FEMS Microbiol. Ecol.* 85:247-256
- Krylova N.I., Janssen P.H. und Conrad R. (1997)** Turnover of propionate in methanogenic paddy soil. *FEMS Microbiology Ecology* 23: 107-117
- Kumaraswamy S., Ramakrishnan B., Satpathy S.N., Rath A.K., Misra S., Rao V.R. und Sethunathan N. (1997)** Spatial distribution of methane-oxidizing activity in a flooded rice soil. *Plant and Soil* 191: 241-248
- Lantin R.S., Wassmann R., Neue H.U. und Buendia L.V. (2000)** Mitigation methane emissions from rice fields in asia. In: *Non-CO₂ greenhouse gases: Scientific understanding, control and*

implementation Van Ham J., Baede A.P.M., Meyer L.A. und Ybema R. (eds.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht: 283-290

Lefroy R.D.B., Mamaril E.P., Blair G.J. und Gonzales P.J. (1992) Sulfur cycling in rice wetlands. In: Sulfur cycling on the continents. Howarth R. W., Stewart, J.W.B. und Ivanov, M.V. (eds.), John Wiley and Sons, Chichester : 279-300

LeMer J., Escoffier S., Chessel C., Roger P.A. (1996) Microbiological aspects of methane emission by a ricefield soil from the Camargue (France). 2. Methanotrophy and related microflora. *European Journal of Soil Biology* 32: 71-80

Lindau C.W. und Bollich P.K. (1993) Methane emission from Louisiana first and ratoon crop rice. *Soil Science* 156: 42-48

Lindau C.W., Alford D.P., Bollich P.K. und Linscombe S.D. (1993) Inhibition of methane evolution by calcium sulfate addition to flooded rice. *Plant and Soil* 158: 299-301

Little C.K., Palumbo A.V., Herbes S.E., Lidstrom M.E., Tyndall R.L. und Gilmer P.J. (1988) Trichlorethylene biodegradation by a methane-oxidizing bacterium. *Applied and Environmental Microbiology* 45: 951-956

Lombardi J.E., Epp M.A. und Chanton J.P. (1997) Investigation of the methyl fluorid technique for determining rhizospheric methane oxidation. *Biogeochemistry* 36: 153-172

Lovley D.R. und Phillips E.J.P. (1986) Organic matter mineralization with reduction of ferric iron in anaerobic sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 51:683-689

Lovley D.R. und Phillips E.J.P. (1987) Competitive mechanisms for inhibition of sulfate reduction and methane production in the zone of ferric iron reduction in sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 53: 2636-2641

Lovley D.R. und Phillips E.J.P. (1987) Rapid assay for microbially reducible ferric iron in aquatic sediments. *Applied and Environmental Microbiology* 53: 1536-1540

Lovley D.R., Giovannoni S.J., White D.C., Champine J.E., Phillips E.J.P., Gorby Y.A. und Goodwin S. (1993) *Geobacter metallireducens* gen. nov., sp. nov., a microorganism capable of coupling the complete oxidation of organic compounds to the reduction of iron and other metals. *Arch. Microbiology* 159: 336-344

Lynch J.H. und Harper S.H.T. (1980) Role of substrates and anoxia in the accumulation of soil ethylene. *Soil Biology and Biochemistry* 12: 363-367

- Lynch J.M. (1972)** Identification of substrates and isolation of microorganisms responsible for ethylene production in the soil. *Nature* 240: 45-46
- Megraw S.R. und Knowles R. (1987)** Methane production and consumption in a cultivated humisol. *Biology and Fertility of Soils* 5: 56-60
- Minami K. und Takata K. (1997)** Atmospheric methane: sources, sinks, and strategies for reducing agricultural emissions. *Water Science and Technology* 36: 509-516
- Minami K., Goudriaan, J., Lantinga E.A. und Kimura T. (1993)** Significance of grasslands in emission and absorption of greenhouse gases. In Proc. 17th Int. Grassland Cong 1231-1238
- Mishra S., Rath A.K., Adhya T.K., Rao V.R. und Sethunathan N. (1997)** Effect of continuous and alternate water regimes on methane efflux from rice under greenhouse conditions. *Biology and Fertility of Soils* 24: 399-405
- Moiser A., Schimel D., Balentine D., Bronson K. und Parton W. (1991)** Methane and nitrous oxide fluxes in native, fertilized and cultivated grasslands. *Nature* 350: 330-332
- Murell J.C., McDonald I.R. und Bourne D.G. (1998)** Molecular methods for the study of methanotroph ecology. *FEMS Microbiology Ecology* 27: 103-114
- Nagahama K., Ogawa T., Fujii T. und Fukada H. (1992)** Classification of ethylene-producing bacteria in term of biosynthetic pathways to ethylene. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 73: 1-5
- Nesbit S.P. und Breitenbeck G.A. (1992)** A laboratory study of factors influencing methane uptake by soils. *Agricultural Ecosystems and Environments* 41: 39-54
- Neue H.U. (1997)** Fluxes of methane from rice fields and potential for mitigation. *Soil Use Manage.* 13: 258-267
- Nomnik H. (1965)** Ammonium fixation and other reactions involving a nonenzymatic immobilization of mineral nitrogen in soil. In: *Soil Nitrogen*. Bartholmew W.V. und Clark F.E. (eds.), Monograph Am. Soc. Agron. 10: 198-258
- O'Dowd R. W., Parsons R. und Hopkins D.W. (1997)** Soil respiration induced by the D- and L- isomers of a range of amino acids. *Soil Biology & Biochemistry* 29: 1665-1671
- Ogawa T., Takahashi M., Fujii T., Tazaki M. und Fukuda H. (1990)** The role of NADH:Fe(III)EDTA Oxidoreductase in ethylene formation from 2-Keto-4-Methylthiobutyrate. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 69: 287-291

- Ottow J.C.G., Benckiser G., Watanabe I. und Santiago S. (1983)** Multiple nutritional soil stress as the prerequisite for iron toxicity of wetland rice (*Oryza sativa*). *Tropical Agriculture, Trinidad* 60: 102-106
- Parfitt R.L. and Smart R.S.C. (1978)** The mechanism of sulfate adsorption on iron oxides. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 42: 48-50
- Patel R.N., Hou C.T., Laskin A.I. und Felix A. (1982)** Microbial oxidation of hydrocarbons: properties of a soluble methane monooxygenase from a facultative methane-utilizing organism, *Methylobacterium* sp. Strain CRL-26. *Applied and Environmental Microbiology* 44: 1130-1137
- Pearman G.I., Etheridge E., de Silra F. und Fraser P.J. (1986)** Evidence of changing concentrations of atmospheric CO₂, N₂O, and CH₄ from air bubbles in Arctic ice. *Nature* 320: 248-250
- Pezet R. und Pont V. (1979)** Methanethiol: a morphogenetic factor produced from L-methionine by *Phomopsis viticola* Sacc. *Can. J. Microbiol.* 1979
- Ponnamperuma F.N. (1972)** The chemistry of submerged soils. *Adv. Agron.* 24: 29-96
- Ponnamperuma F.N., Bradfield R. und Peech M. (1955)** Physiological disease of rice attributable to iron toxicity. *Nature* 265: 44-49
- Priemé A. und Christensen S. (1997)** Seasonal and spatial variation of methane oxidation in a Danish spruce forest. *Soil Biology & Biochemistry* 29: 1165-1172
- Priemé A., Christensen S., Dobbie K.E. und Smith K.A. (1997)** Slow increase in rate of methane oxidation in soils with time following land use change from arable agriculture to woodland. *Soil Biology and Biochemistry* 29:1369-1373
- Purkhold U., Pommerening-Röser A., Juretschko S., Schmid M.C., Koops H.-P. und Wagner M. (2000)** Phylogeny of all recognized species of ammonia oxidizers based on comparative 16S rRNA and amoA sequence analysis: implications for molecular diversity surveys 66: 5368-5382
- Rabinowitch H.D. und Fridovich I. (1983)** Superoxide radicals, superoxide dismutases and oxygen toxicity in plants. *Photochemistry and Photobiology* 37: 679-690
- Ramakrishnan B., Kumaraswamy S., Mallick K., Adhya T.K., Rao V.R. und Sethunathan N. (1998)** Effect of various anionic species on net methane production in flooded rice soils. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 14: 743-749

- Rasmussen R.A. und Khalil M.A.K. (1984)** Atmospheric methane in the recent and ancient atmosphere: Concentrations, trends, and interhemispheric gradient. *Journal of Geophysical Research* 89:11.599-11.605
- Ratering S. und Conrad R. (1998)** Effects of short-term drainage and aeration on the production of methane in submerged rice soil. *Global Change Biology* 4: 397-407
- Ratering S. und Schnell S. (2000)** Localisation of iron-reduction activity in paddy soil by profile studies. *Biogeochemistry* 48: 341-365
- Rath A.K., Swain B., Ramakrishnan B., Panda D., Adhya T.K., Rao V.R. und Sethunathan N. (1999)** Influence of fertilizer management and water regime on methane emission from rice fields. *Agriculture Ecosystems and Environment* 76: 99-107
- Reichardt W., Mascarina G., Padre B. und Doll J. (1997)** Microbial communities of continuously cropped, irrigated rice fields. *Applied and Environmental Microbiology* 63: 233-238
- Rigler E. und Zechmeister-Boltenstern S. (1998)** Influence of nitrogen and carbon dioxide on ethylene and methane production in two different forest soils. *Microbiol. Res.* 153: 227-237
- Rigler E. und Zechmeister-Boltenstern S. (1999)** Oxidation of ethylene and methane in forest soils-effect of CO₂ and mineral nitrogen. *Geoderma* 90: 147-159
- Roden E.E. und Zachara J.M. (1996)** Microbial reduction of crystalline iron(III) oxides: Influence of oxide surface area and potential for cell growth. *Environ. Sci. Technol.* 30: 1618-1628
- Rodhe H. (1990)** A comparison of the contribution of various gases to the greenhouse effect. *Science* 248: 1217-1219
- Roslev P. und Iversen N. (1999)** Radioactive fingerprinting of microorganisms that oxidize atmospheric methane in different soils. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 4064-4070.
- Roslev P., Iversen N. und Henriksen K. (1997)** Oxidation and Assimilation of atmospheric methane by soil methane oxidizers. *Applied and Environmental Microbiology* 63: 874-880
- Sass R.L., Fisher F.M., Harcombe P.A. und Turner F.T. (1991)** Mitigation of methane emission from rice fields: possible adverse effects of incorporated rice straw. *Global Biogeochemical Cycles* 5: 275-287
- Sass R.L., Fisher F.M., Wand Y.B., Turner F.T. und Jund M.F. (1992)** Methane emission from rice fields: the effect of floodwater management. *Global Biogeochemical Cycles* 6: 249-262

- Sato M., Watanabe K., Yazawa M., Takikawa Y. und Nishiyama K. (1997)** Detection of new ethylene-producing bacteria, *Pseudomonas syringae* pvs. *cannabina* and *sesami*, by PCR amplification of genes for the ethylene-forming enzyme. *Phytopathology* 87: 1192-1196
- Sawada S. und Totsuka T. (1986)** Natural and antropogenic sources and fate of atmospheric ethylene. *Atmospheric Environment* 20: 821-832
- Scherer H.W. und Zhang Y. (1999)** Studies on the mechanisms of fixation and release of ammonium in paddy soils after flooding. I. Effect of iron oxides on ammonium fixation. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 162: 593-597
- Schlichting, E. und Blume H.P. (1966)** *Bodenkundliches Praktikum*. Verlag Paul Parey, Hamburg
- Schneiders M. und Scherer H.W. (1998)** Fixation and release of ammonium in flooded rice soils as affected by redox potential. *European Journal of Agronomy* 8: 181-189
- Schnell S. und King G.M. (1994)** Mechanistic analysis of ammonium inhibition of atmospheric methane consumption in forest soils. *Applied and Environmental Microbiology* 60: 3514-3521
- Schnell S. und King G.M. (1995)** Stability of methane oxidation capacity to variations in methane and nutrient concentrations. *FEMS Microbiology Ecology* 17: 285-294
- Schnell S. und King G.M. (1996)** Responses of methanotrophic activity in soils and cultures to water stress. *Applied and Environmental Microbiology* 62: 3203-3209
- Schnell S., Ratering S. und Jansen K.-H. (1998)** Simultaneous determination of Fe(II), Fe(III), and Mn(II) by a chromatographic method. *Environmental and Science Technology* 32: 1530-1537
- Schütz H., Holzapfel-Pschorn A., Conrad R., Rennenberg H. und Seiler W. (1989)** A 3-year continuous record on the influence of daytime, season, and fertilizer treatment on methane emission rates from an Italian rice paddy. *Journal of Geophysical Research* 94: 16.405-16.416
- Schwertmann U. (1988)** Some properties of soil and synthetic iron oxides. In: Iron and soil clay minerals. Stucki J.W., Goodman B.A., und Schwertmann U. (eds), Reidel, Publishing Company, Dordrecht Vol. 217: 203-250
- Schwertmann U. und Cornell R.M. (1991)** Iron oxides in the laboratory, preparation and characterization. VCH, Weinheim
- Schwertmann U. und Taylor R.M. (1989)** Iron Oxides In: Minerals in soil environments. Dixon J.B. und Weed S.B. (eds), SSSA Book Series, Madison Vol. 1: 378-438
- Segal W. und Starkey R.L. (1969)** Microbial decomposition of methionine and identity of the resulting sulfur products. *J. Bacteriol.* 98: 41-44

- Seiler W., Conrad R. und Scharffe D. (1984)** Field studies of methane emission from termite nests into the atmosphere and measurements of methane uptake by tropical soils. *Journal of Atmospheric Chemistry* 1: 171-186
- Senwo Z.N. und Tabatai (1998)** Amino acid composition of soil organic matter. *Biology and Fertility of Soils* 26: 235-242
- Sigren L.K., Lewis S.T., Fisher F.M. und Sass R.L. (1997)** Effects of field drainage on soil parameters related to methane production and emission from rice paddies. *Global Biogeochemical Cycles* 11: 151-162
- Silver W.L., Lugo A.E. und Keller M. (1999)** Soil oxygen availability and biogeochemistry along rainfall and topographic gradients in upland wet tropical forest soils. *Biogeochemistry* 44: 301-328
- Singh J.S., Singh S., Raghubanshi A.S., Singh S. und Kashyap A.K. (1996)** Methane flux from rice/wheat agroecosystem as affected by crop phenology, fertilization and water level. *Plant and Soil* 183: 323-327
- Singh J.S., Raghubanshi A.S., Reddy V.S., Singh S. und Kashyap A.K. (1998a)** Methane flux from irrigated paddy and dryland rice fields, and from seasonally dry tropical forest and savanna soils of India. *Soil Biology & Biochemistry* 30: 135-139
- Singh S., Singh J.S. und Kashyap A.K. (1998b)** Contrasting pattern of methane flux in rice agriculture. *Naturwissenschaften* 85: 494-497
- Smith A.M. (1973)** Ethylene as a cause of soil fungistasis. *Nature* 246: 311-313
- Snowden R.E.D. und Wheeler B.D. (1995)** Chemical changes in selected wetland plant species with increasing Fe supply, with specific reference to root precipitates and Fe tolerance. *New Phytol.* 131: 503-520
- Söhngen N.L. (1906)** Über Bakterien, welche Methan als Kohlenstoffnahrung und Energiequelle gebrauchen. *Centralbl. Bakt. Parasitenk.* 15: 513-517
- Stackebrandt E., Rainey F.A. und Ward-Rainey N.L. (1997)** Proposal for a new hierarchic classification system, *Actinobacteria* classis nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* 47: 479-491
- Stern D.I. und Kaufmann R.K. (1996)** Estimates of global anthropogenic methane emissions 1860 - 1993. *Chemosphere* 33: 159-176
- Strauss R., Brümmer G.W. und Barrow N.J. (1997)** Effects of crystallinity of goethite: II. Rates of sorption and desorption of phosphate. *European Journal of Soil Science* 48: 101-114

- Stuedler P.A., Bowden R.D., Melillo J.M. und Aber J.D. (1989)** Influence of nitrogen fertilization on methane uptake in temperate forest soils. *Nature* 341: 314-316
- Striegl R.G., McConnaughey T.A., Thorstenson D.C., Weeks E.P. und Woodward J.C. (1992)** Consumption of atmospheric methane by desert soils. *Nature* 357: 145-147
- Striling D.I. und Dalton H. (1979)** The fortuitous oxidation and cometabolism of various carbon compounds by whole-cell suspensions of *Methylococcus capsulatus* (Bath). *FEMS Microbiology Letters* 5: 315-318
- Stucki J.W., Golden D.C. und Toth C.B. (1984)** Effects of reduction and reoxidation of structural iron on clay swelling. *Clays Clay Miner.* 32: 350-356
- Takahashi T., Park C.-Y., Nakajima H., Sekiya J. und Toriyama K. (1999)** Ferric iron transformation in soils with rotation of irrigated rice-upland crops and effect on soil tillage properties. *Soil Science and Plant Nutrition* 45: 163-173
- Topp E. (1993)** Effects of selected agrochemicals on methane oxidation by an organic agricultural soil. *Canadian Journal of Soil Science* 73: 287-291
- Trolldenier G. (1988)** Visualisation of oxidizing power of rice roots and of possible participation of bacteria in iron deposition. *Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde* 151: 117-121
- Trolldenier G. (1995)** Methanogenesis during rice growth as related to the water regime between crop seasons. *Biology and Fertility of Soils* 19: 84-86
- Trudgill P.W. (1990)** Microbial metabolism of monoterpenes-recent developments. *Biodegradation* 1: 93-105
- Turner L.J. und Kramer J.R. (1991a)** Irreversibility of sulfate sorption on goethite and hematite. *Water, Air, and Soil Pollution* 63: 23-32
- Turner L.J. und Kramer J.R. (1991b)** Sulfate ion binding on goethite and hematite. *Soil Science* 152: 226-230
- Ueki A., Ono K., Tsuchiya A. und Ueki K. (1997)** Survival of methanogens in air-dried paddy field soil and their heat tolerance. *Water Science and Technology* 36 517-522
- van Cleemput O., El-Sebaay A.S. und Baert L. (1983)** Evolution of gaseous hydrocarbons from soil, effect of moisture content and nitrate level. *Soil Biology & Biochemistry* 15: 519-524
- van Bodegom P.M. und Stams A.J.M. (1999)** Effect of alternative electron acceptors and temperature on methanogenesis in rice paddy soils. *Chemosphere* 39: 167-182

- van Ginkel C.G., Welten H.G.J. und de Bont J.A.M (1987)** Oxidation of gaseous and volatile hydrocarbons by selected alkene-utilizing bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 53: 2903-2907
- Vlieg J.E.T.V., Dekoning W. und Janssen D.B. (1996)** Transformation kinetics of chlorinated ethenes by *Methylosinus trichosporium* OB3b and detection of unstable epoxides by on-line gas chromatography. *Applied Environmental Microbiology* 62: 3304-3312
- Wang F.L. und Bettany J.R. (1995)** Methane emission from a usually well-drained prairie soil after snowmelt and precipitation. *Canadian Journal of Soil Science* 75: 239-241
- Wassmann R., Papen H. und Rennenberg H. (1993)** Methane emission from rice paddies and possible mitigation strategies. *Chemosphere* 26: 201-217
- Watanabe A., Kajiwara M., Tashiro T. und Kimura M. (1995)** Influence of rice cultivar on methane emission from paddy fields. *Plant and Soil* 176: 51-56
- Watanabe A. und Kimura M. (1999)** Influence of chemical properties of soils on methane emission from rice paddies. *Commun. Soil. Sci. Plant Anal.* 30: 2449-2463
- Watanabe I. und Furusaka C. (1980)** Microbial ecology of flooded rice soils. In: *Advances in Microbial Ecology*. Alexander M. (eds.), Plenum Publishing, New York & London: 125-186
- Watanabe I., Hashimoto T. und Shimoyama A. (1997)** Methane-oxidizing activities and methanotrophic populations associated with wetland rice plants. *Biology and Fertility of Soils* 24: 261-265
- Watson R.T., Meira Filho L.G., Sanhueza E. und Janetos A. (1992)** Greenhouse gases: sources and sinks. In: Houghton, J.T., Callander, B.A., Varney, S.K: (eds.), *Climate Change 1992. The Supplementary Report to the IPCC Scientific Assessment*. Cambridge University Press, Cambridge: 25-46
- Watwood M.E., Fitzgerald J.W. und Swank W.T. (1988)** Effects of moisture content on sulfate generation and retention in hardwood forest upper soil horizons. *Canadian Journal of Forest Research* 18: 820-824
- Weber J.R., Munch J.C. und Ottow J.C.G. (1979)** Einfluß der Teilchengröße auf die bakterielle Reduzierbarkeit pedogener Eisenoxide. *Mitteilung Dtsch. Bodenkundl. Gesellsch.* 29: 465-472
- Whalen S.C. und Reeburgh W.S. (1990)** Consumption of atmospheric methane by tundra soil. *Nature* 346: 160-162

- Wheeler B.D., Al-Farraj M.M. und Cook R.E.D. (1985)** Iron toxicity to plants in base-rich wetlands: comparative effects on the distribution and growth of *Epilobium Hirsutum* L. and *Juncus Subnodulosus* Schrank. *New Phytol.* 100: 653-669
- White C.S. (1988)** Nitrification inhibition by monoterpenoids: theoretical mode of action based on molecular structures. *Ecology* 69: 1631-1633
- White C.S. (1994)** Monoterpenes: their effects on ecosystem nutrient cycling. *J. Chem. Ecol.* 20: 1381-1405
- Whittebury R., Phillips K.C. und Wilkinson J.F. (1970a)** Enrichment, Isolation and some properties of methane-utilizing bacteria. *Journal of General Microbiology* 61: 205-218
- Whittenbury R., Davies S.L. und Davey J.F. (1970b)** Exospores and cysts formed by methane utilizing bacteria. *Journal of General Microbiology* 61: 219-226
- Wickland K.P., Striegl R.G., Schmidt S.K. und Mast M.A. (1999)** Methane flux in subalpine wetland and unsaturated soils in the southern Rocky Mountains. *Global Biogeochemical Cycles* 13: 101-113
- Willson T.W., Webster C.P., Goulding K.W.T. und Powlson D.S. (1995)** Methane oxidation in temperate soils: Effects of land use and the chemical form of nitrogen fertilizers. *Chemosphere* 30: 539-546
- Wilt, F. M., Miller, G. C., Everett, R. L., Hackett, M. (1993)** Monoterpene concentration in fresh, senescent, and decaying foliage of single-leaf pinyon (*Pinus monophylla* Torr & Fern.: Pinaceae) from western great basin. *J. Chem. Ecol.* 19: 185-194
- Wood S.E., Gaskin J.F. und Langenheim J.H. (1995)** Loss of monoterpenes from *Umbellularia californica* leaf litter. *Biochemical Systematics and Ecology* 23: 581-591
- World Meteorological Organisation (WMO) (1999)** Scientific Assessment of Ozon Depletion: 1998. Global ozone and Research and monitoring project report 44, Geneva.
- Wu P., Hu B., Liao C.Y., Zhu J.M., Wu Y.R., Senadhira D. und Paterson (1998)** Characterization of tissue tolerance to iron by molecular markers in different lines of rice. *Plant and Soil* 203: 217-226
- Wu P., Luo A., Zhu J., Yang J., Huang N. und Senadhira D. (1997)** Molecular markers linked to genes underlying seedling tolerance for ferrous iron toxicity. *Plant and Soil* 196: 317-320
- Wuebbles D.J., Jain A., Edmonds J., Hayhoe D. und Harvey K. (1999)** Global change: state of the science. *Environmental Pollution* 100: 57-86

- Yagi K., Tsuruta H. und Minami K. (1997)** Possible options for mitigating methane emission from rice cultivation. *Nutrient Cycling in Agroecosystems* 49: 213-220
- Yagi K., Tsuruta H., Kanda K. und Minami K. (1996)** Effect of water management on methane emission from a Japanese rice paddy field: automated methane monitoring. *Global Biogeochemical Cycles* 10: 255-267
- Yao H., Conrad R. Wassmann R. und Neue H.U. (1999)** Effect of soil characteristics on sequential reduction and methane production in sixteen rice paddy soils from China, the Phillipines, and Italy. *Biogeochemistry*. 47: 269-295
- Yavitt J.B., Downey D.M., Lancaster E. und Lang G.E. (1990a)** Methane consumption in decomposition Sphangum-derived peat. *Soil Biology & Biochemistry* 22: 441-447
- Yavitt J.B., Downey D.M., Lang G.E. und Sextone A.J. (1990b)** Methane consumption in two temperate forest soils. 9: 39-52
- Yavitt J.B., Fahey T.J. und Simmons J.A. (1995)** Methane and carbon dioxide dynamics in a northern hardwood ecosystem. *Soil Science Society of America Journal* 59: 796-804
- Zechmeister-Boltenstern S. und Nikodim L. (1999)** Effect of water tension on ethylene production and consumption in montane and lowland soils in Austria. *European Journal of Soil Science* 50: 425-432
- Zechmeister-Boltenstern S. und Smith K.A. (1998)** Ethylene production and decomposition in soils. *Biology and Fertility of Soils* 26: 354-361
- Zehnder A.J.B. and Stumm W. (1988)** Geochemistry and biogeochemistry of anaerobic habitats. In: *Biology of anaerobic microorganisms*. Zehnder A.J.B. (eds.), Wiley Interscience Publications, New York: 1-38
- Zhang C., Liu S., Phelps T.S., Cole D.R., Horita J., Fortier S.M., Elless M. und Valley J.W. (1997)** Physiochemical, mineralogical, and isotopic characterization of magnetite-rich iron oxides formed by thermophilic iron-reducing bacteria. *Geochim. Cosmochim. Acta* 61: 4621-4632
- Zhang Y.S. und Scherer H.W. (1999)** Ammonium fixation by clay minerals in different layers of two paddy soils after flooding. *Biology and Fertility of Soils* 29: 152-156



PERGAMON

Soil Biology & Biochemistry 32 (2000) 1811–1814

**Soil Biology &
Biochemistry**

www.elsevier.com/locate/soilbio

Short communication

Suppression of methane emission from rice paddies by ferric iron fertilization

Udo Jäckel, Sylvia Schnell*

Max-Planck-Institute for Terrestrial Microbiology, 35043 Marburg, Germany

Accepted 24 March 2000

Abstract

Rice microcosms incubated in the greenhouse showed that methane emission was reduced after fertilization of the soil with ferric iron oxide–ferrihydrite. The total methane emission during the vegetation period of rice was reduced by 43% and 84%, with the addition of 15 and 30 g of ferrihydrite per kg of soil, respectively. Growth of the rice plants was reduced during the first few weeks in the ferrihydrite fertilized soil but was unchanged after 14 weeks. The number of rice seeds produced per plant was identical after the lower iron fertilization and was 82% of the control after the higher iron fertilization. The presence of ferric iron suppressed methanogenesis and methane emission in rice microcosms. © 2000 Elsevier Science Ltd. All rights reserved.

Keywords: Ferrihydrite; Rice soil; Methane production; Plant growth

Rice paddies are a significant source of atmospheric methane (Cicerone and Oremland, 1988; Shearer and Khalil, 1993; Prinn, 1994) and therefore contribute to global warming. Since rice represents a staple food for about half of mankind, a large part of the world's agricultural land is used for the cultivation of rice. Methane production is the final step in a series of sequential reduction processes that are initiated when rice paddies are flooded (Takai, 1961; Patrick and Reddy, 1978; Ponnampertuma, 1981; Watanabe, 1984). The sequence of microbial processes, with nitrate as the electron acceptor, that is used first after the depletion of oxygen followed by manganese(IV), iron(III), sulfate, and carbon dioxide can be theoretically explained with the thermodynamic theory (Zehnder and Stumm, 1988). The electron acceptors are ordered according to their redox potential, which determines the energy yield of the process. Substrate

utilization is possible at lower concentrations with electron acceptors with a higher redox potential. Therefore, competition for substrates between the different physiological groups of bacteria is one explanation for the observed sequential operation of the redox processes. Consequently, the availability of organic substrates is one factor that determines the temporal sequence of processes. Similarly, the amount of electron acceptors in an environment determines the contribution of the specific microbial process to total anaerobic degradation of organic matter. In slurry experiments with paddy soil, the addition of nitrate, iron(III), and sulfate was inhibitory for methane production (Achnich et al., 1995a, 1995b; Klüber and Conrad, 1998). The main mechanism for nitrate inhibition of methanogenesis was the formation of toxic denitrification intermediates rather than competition between denitrifiers and methanogens for substrate (Roy and Conrad, 1999). The addition of iron(III) and sulfate to paddy soil, however, caused an immediate decrease in the hydrogen partial pressure (Achnich et al., 1995b). Thermodynamic calculations of hydrogen-dependent methanogenesis showed Gibbs free energies

* Corresponding author. Max-Planck-Institute for Marine Microbiology, Celsiusstr. 1, D-28359 Bremen, Germany. Tel.: +49-421-2028-744; fax: +49-421-2028-790.

E-mail address: sschnell@mpi-bremen.de (S. Schnell).

of -10 kJ mol^{-1} of methane — values that no longer permit methane production (Yao and Conrad, 1999).

In this study the effect of ferrihydrite addition to rice soil was examined with respect to methane emission and plant growth during the vegetation of rice until ripe grains could be harvested.

The soil originated from a rice field located in the Po River valley near Arborio (Italy) and was characterized as silty loam (S. Ratering, personal communication). Ferrihydrite was prepared according to Schwertmann and Cornell (1991). The ferrihydrite suspension was washed with deionized water by centrifugation at $9700 \times g$ to remove Na^+ and Cl^- . The ferrihydrite suspension was shock frozen with liquid nitrogen and then freeze dried. Plastic beakers were used as planting pots, containing 1 kg of paddy soil that was sieved through a mesh size of $<1 \text{ mm}$. Three assays were performed consisting of five replicates each. Ferrihydrite (15 or 30 g) was added to two of the three assays. The lower ferrihydrite treatment doubled the indigenous reducible ferric iron amount in the soil. To the five control beakers, no ferrihydrite was added and the soil of all of them was suspended with deionized water. Rice grains were germinated on wet cellulose filters, and one seedling was planted in each of the 15 plastic beakers. After 6 weeks, all plants were fertilized with 2.6 mmol nitrogen per beaker — applied as dissolved $(\text{NH}_4)_2 \text{HPO}_4$.

Methane emission of the different assays was measured using flux chambers, containing ventilators, that were put over each single plant. The diameter of the chambers was such that they fit inside the plastic beakers, using the flooding water as a gas seal. The length of the chambers was adjusted to the plant size. Methane fluxes were measured in the greenhouse over 2 h in the afternoon. Methane was analyzed by gas

chromatography using a flame ionization detector (Conrad et al., 1987). After 144 days the number of seeds per plant was determined. Then the dry weight of the plants was determined after washing the soil off the roots and oven drying each single plant at 105°C until weight constancy.

Methane emission rates of the microcosms with ferrihydrite in the soil, were lower than the controls during the whole vegetation period (Fig. 1). Methane emission increased during the growth of the rice plants. This observation is in agreement with the field measurements of methane emission (Schütz et al., 1989a, 1989b). Increasing methane emission is probably due to a stimulation of methanogenesis by root exudates and the decay of plant material like straw (Schütz et al., 1989a, 1989b). Methane emission in the assays with ferrihydrite addition did not increase between day 21 and 32 in contrast to the control assay that increased from 189 to $1293 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ methane (Fig. 1). This was due to a slower growth of the rice plants in the ferrihydrite microcosms within the first six weeks. In slurry experiments, ferrous iron production was highest between day 1 and 8. In the initial phase of flooding, the production of Fe^{2+} is faster than the iron carbonate (siderite) precipitation (Neue, 1991). Dissolved ferrous iron can be toxic for wetland plants (Green and Etherington, 1977). Iron-rich rice paddies are known to give lower rice yields because of the iron toxicity (Fageria and Rabelo, 1987). In rice plants, the iron toxicity is characterized by bronzing of the lower leaves which can spread in severe cases also to the upper leaves (Tanaka et al., 1966). The toxic effects of Fe(II) are mediated by the ability of ferrous iron to generate potent oxidizing hydroxyl radicals (Haber–Weiss–Fenton reaction) inside the cells. The oxidizing activity of roots in waterlogged soil, leading to an accumulation of ferric iron on the root surface, is probably one mechanism preventing the diffusion of soluble ferrous iron inside the roots (Armstrong, 1967; Armstrong et al., 1991; Bartlett, 1961). Rooted rice soil showed lower methane concentrations and higher E_h than unrooted soil (Frenzel et al., 1999). Methane production rates measured in vitro showed a longer lag phase in the rooted soil, compared to the unrooted soil. This resulted from a shift of the electron flow from methanogenesis to iron reduction in the presence of ferric iron (Frenzel et al., 1999). The rice roots, that were growing in the ferrihydrite fertilized pots, showed an increased precipitation of iron(III) oxides, which was obvious by the brown coloration of the roots.

After the initial delay of rice plant growth in the presence of ferrihydrite, the plants later made up in biomass and length. The rice plants in the ferrihydrite assays were slightly taller than the control plants and they also flowered earlier. Fewer weeds were observed in the microcosms with ferrihydrite,

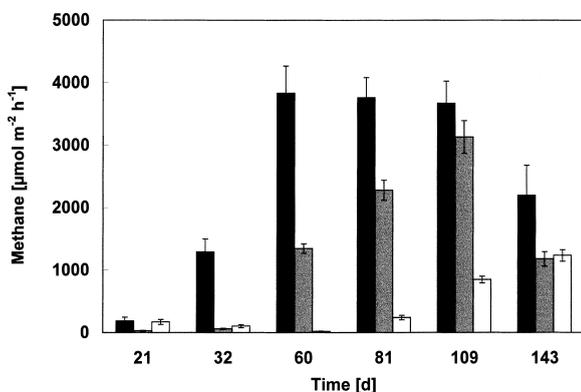


Fig. 1. Methane emission rates at different time points during the vegetation of rice microcosms consisting of one rice plant each in a planting pot containing 1 kg rice soil. Black columns represent microcosms without ferrihydrite, grey columns with 15 g ferrihydrite and white columns with 30 g ferrihydrite per microcosm. Means and standard errors of quintuples are given.

Table 1

Methane emission, plant dry weight, and number of rice seeds in a microcosm experiment with ferrihydrite fertilization of the rice soil. The iron fertilization was performed before planting the rice seedlings. Total methane emission was integrated over the time of 143 days. The number of rice seeds and the dry weight of the rice plants including the roots were determined after 143 days. Means and standard errors of quintuples are given. For statistical analyses values of total methane emission were log-transformed. Homogeneity of variance across treatments was tested with Levene Statistic ($P = 0.117$). Total methane emission of each treatment differed significantly from the other two (one-way ANOVA, $P < 0.001$, multiple comparisons by the Bonferroni method)

Microcosms	Total methane emission (g)	Total methane emission (%)	Dry weight per plant (g)	Rice seeds per plant
Control	139.6 ± 14.1	100.0	23.1 ± 0.3	141 ± 4
15 g ferrihydrite per kg soil	79.7 ± 4.1	57.1	16.1 ± 0.4	142 ± 6
30 g ferrihydrite per kg soil	21.7 ± 0.6	15.6	12.1 ± 0.2	116 ± 3

which could be explained by an iron toxicity effect. In fact, many wetland plant species are known to be less tolerant to iron than rice (Snowden and Wheeler, 1995). The methane emission increased up to day 109, in the presence of ferrihydrite, whereas it increased only for the first 60 days in the controls and then stayed constant until day 109. The methane emission typically decreased again at the end of the rice growth, probably due to the decreasing activity of the rice plants.

At the end of the experiment methane emission was integrated over 143 days (Table 1). In the assay with 15 g ferrihydrite per kg soil, methane emission was 57% of that of the control microcosms. The higher ferrihydrite fertilization only showed 16% of methane emission. Lower methane emission in ferrihydrite amended pot experiments were also observed by Koyama and Kimura (1998) and Watanabe and Kimura (1999). In both studies an inhibition of methane production by reducible ferric iron was discussed; however, no emphasis was put on the effects of this treatment on the rice plants. The yield of the rice plants, however, is an important agronomic factor. Therefore, the number of rice seeds and the dry weight of the plants including the roots were determined (Table 1). One plant of the control microcosms had a dry weight of 23 ± 0.5 g and 141 ± 7 rice seeds. The dry weight of the plants decreased with higher amounts of ferrihydrite fertilization whereas the number of rice seeds was as in the control, after the lower ferrihydrite fertilization. With a ferrihydrite addition of 30 g per kg of soil, only 116 ± 6 rice seeds were harvested per plant.

The drastic reduction of methane emission of the microcosms with ferrihydrite addition to rice soil suggests that the fertilization with iron oxide could be an option to reduce the methane emission from rice paddies. The amount of iron oxide used for fertilization, however, has to be determined carefully in view of the iron toxicity of the rice plants.

Acknowledgements

We thank Stefan Ratering for stimulating discussions, Peter Dunfield for helpful advice with the statistics, and Horst Henseling for excellent technical assistance.

References

- Achtnich, C., Bak, F., Conrad, R., 1995a. Competition for electron donors among nitrate reducers, ferric iron reducers, sulfate reducers, and methanogens in anoxic paddy soil. *Biology & Fertility of Soils* 19, 65–72.
- Achtnich, C., Schuhmann, A., Wind, T., Conrad, R., 1995b. Role of interspecies H_2 transfer to sulfate and ferric iron-reducing bacteria in acetate consumption in anoxic paddy soil. *FEMS Microbiology Ecology* 16, 61–69.
- Armstrong, W., 1967. The oxidising activity of roots in waterlogged soils. *Physiologia Plantarum* 20, 920–926.
- Armstrong, W., Justin, S.H.F.W., Beckett, P.M., Lythe, S., 1991. Root adaptation to soil waterlogging. *Aquatic Botany* 39, 57–73.
- Bartlett, R.J., 1961. Iron oxidation proximate to plant roots. *Soil Science* 92, 372–379.
- Cicerone, R.J., Oremland, R.S., 1988. Biogeochemical aspects of atmospheric methane. *Global Biogeochemical Cycles* 2, 299–327.
- Conrad, R., Schütz, H., Babel, M., 1987. Temperature limitation of hydrogen turnover and methanogenesis in anoxic paddy soil. *FEMS Microbiology Ecology* 45, 281–289.
- Fageria, N.K., Rabelo, N.A., 1987. Tolerance of rice cultivars to iron toxicity. *Journal of Plant Nutrition* 10, 653–661.
- Frenzel, P., Bosse, U., Janssen, P.H., 1999. Rice roots and methanogenesis in a paddy soil: ferric iron as an alternative electron acceptor in rooted soil. *Soil Biology & Biochemistry* 31, 421–430.
- Green, M.S., Etherington, J.R., 1977. Oxidation of ferrous iron by rice (*Oryza sativa* L.) roots: a mechanism for waterlogging tolerance? *Journal of Experimental Botany* 104, 678–690.
- Klüber, H.D., Conrad, R., 1998. Effects of nitrate, nitrite, NO, and N_2O on methanogenesis and other redox processes in anoxic rice soil. *FEMS Microbiology Ecology* 25, 301–318.
- Koyama, T., Kimura, M., 1998. Inhibitors for the methane fermentation in paddy soils. *Soil Science & Plant Nutrition* 44, 667–674.
- Neue, H.U., 1991. A holistic view of the chemistry of flooded soils. Soil management for sustainable rice production in the tropics. International Board for Soil Research and Management. IBSRAM Monograph No. 2, pp. 5–32.
- Patrick Jr., W.H., Reddy, C.N., 1978. Chemical changes in rice soils.

- In: Institute IRR (Ed.), *Soil and Rice*. IRRI, Los Banos, Philippines, pp. 361–379.
- Ponnamperuma, F.N., 1981. Some aspects of the physical chemistry of paddy soils. In: Sinica, A. (Ed.), *Proceedings of Symposium on Paddy Soil*. Science Press–Springer, Beijing/Berlin, pp. 59–94.
- Prinn, R.G., 1994. Global atmospheric–biospheric chemistry. In: Prinn, R.G. (Ed.), *Global Atmospheric–Biospheric Chemistry*. Plenum, New York, pp. 1–18.
- Roy, R., Conrad, R., 1999. Effect of methanogenic precursor (acetate, hydrogen, propionate) on suppression of methane production by nitrate in anoxic rice field soil. *FEMS Microbiology Ecology* 28, 49–61.
- Schütz, H., Holzapfel-Pschorn, A., Conrad, R., Rennenberg, H., Seiler, W., 1989a. A 3-year continuous record on the influence of daytime, season, and fertilizer treatment on methane emission rates from an Italian rice paddy. *Journal of Geophysical Research* 94, 16405–16416.
- Schütz, H., Seiler, W., Conrad, R., 1989b. Processes involved in formation and emission of methane in rice paddies. *Biogeochemistry* 7, 33–53.
- Schwertmann, U., Cornell, R.M., 1991. *Iron Oxides in the Laboratory: Preparation and Characterization*. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim.
- Shearer, M.J., Khalil, M.A.K., 1993. Rice agriculture: emissions. In: Khalil, M.A.K. (Ed.), *Atmospheric Methane: Sources, Sinks, and Role in Global Change*. Springer, Berlin, pp. 230–253.
- Snowden, R.E.D., Wheeler, B.D., 1995. Chemical changes in selected wetland plants species with increasing Fe supply, with specific reference to root precipitates and Fe tolerance. *The New Phytologist* 131, 503–520.
- Takai, Y., 1961. Reduction and microbial metabolism in paddy soil (3). *Nogyo Gijutsu (Agricultural Technology)* 16, 122–126 (Japanese).
- Tanaka, A., Loe, R., Navasero, S.A., 1966. Some mechanisms involved in the development of iron toxicity symptoms in the rice plant. *Soil Science & Plant Nutrition* 12, 158–164.
- Yao, H., Conrad, R., 1999. Thermodynamics of methane production in different rice paddy soils from China, the Philippines and Italy. *Soil Biology and Biochemistry* 31, 463–473.
- Watanabe, I., 1984. Anaerobic decomposition of organic matter in flooded rice soil. In: Institute IRR (Ed.), *Organic Matter and Rice*. IRRI, Los Banos, Philippines, pp. 237–238.
- Watanabe, A., Kimura, M., 1999. Influence of chemical properties of soils on methane emission from rice paddies. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 30, 2449–2463.
- Zehnder, A.J.B., Stumm, W., 1988. *Geochemistry and biogeochemistry of anaerobic habitats*. In: Zehnder, A.J.B. (Ed.), *Biology of Anaerobic Microorganisms*. Wiley Interscience, New York, pp. 1–38.

Molecular Analyses of Novel Methanotrophic Communities in Forest Soil That Oxidize Atmospheric Methane

THILO HENCKEL, UDO JÄCKEL, SYLVIA SCHNELL, AND RALF CONRAD*

*Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie, Karl-von-Frisch-Strasse,
35043 Marburg, Germany*

Received 1 October 1999/Accepted 7 January 2000

Forest and other upland soils are important sinks for atmospheric CH₄, consuming 20 to 60 Tg of CH₄ per year. Consumption of atmospheric CH₄ by soil is a microbiological process. However, little is known about the methanotrophic bacterial community in forest soils. We measured vertical profiles of atmospheric CH₄ oxidation rates in a German forest soil and characterized the methanotrophic populations by PCR and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) with primer sets targeting the *pmoA* gene, coding for the α subunit of the particulate methane monooxygenase, and the small-subunit rRNA gene (SSU rDNA) of all life. The forest soil was a sink for atmospheric CH₄ in situ and in vitro at all times. In winter, atmospheric CH₄ was oxidized in a well-defined subsurface soil layer (6 to 14 cm deep), whereas in summer, the complete soil core was active (0 cm to 26 cm deep). The content of total extractable DNA was about 10-fold higher in summer than in winter. It decreased with soil depth (0 to 28 cm deep) from about 40 to 1 μ g DNA per g (dry weight) of soil. The PCR product concentration of SSU rDNA of all life was constant both in winter and in summer. However, the PCR product concentration of *pmoA* changed with depth and season. *pmoA* was detected only in soil layers with active CH₄ oxidation, i.e., 6 to 16 cm deep in winter and throughout the soil core in summer. The same methanotrophic populations were present in winter and summer. Layers with high CH₄ consumption rates also exhibited more bands of *pmoA* in DGGE, indicating that high CH₄ oxidation activity was positively correlated with the number of methanotrophic populations present. The *pmoA* sequences derived from excised DGGE bands were only distantly related to those of known methanotrophs, indicating the existence of unknown methanotrophs involved in atmospheric CH₄ consumption.

The atmospheric concentration of CH₄, one of the most important greenhouse gases, has increased dramatically over the past 200 years. About 80 to 90% of atmospheric CH₄ is of biogenic origin (20). The major sink is the chemical destruction by OH \cdot and Cl \cdot radicals in the troposphere and stratosphere, respectively (9, 10). However, the capacity of these atmospheric sinks may decline, since the rising concentrations of other trace gases emitted by anthropogenic activity result in a reduction of OH \cdot radicals in the troposphere (27).

The only biological sink for CH₄ is oxidation in soil. Atmospheric CH₄ is consumed in forest, agricultural, and other upland soils. CH₄ consumption in these soils is caused by methane-oxidizing bacteria. However, the identity of these methanotrophs is still unknown. The apparent half-saturation constant (K_m) for oxidation of atmospheric CH₄ (approximately 1.8 parts per million by volume [ppmv]) in upland soils ranges from 0.8 to 280 nM (6, 7, 13, 16). However, the K_m of the common type I or II methanotrophs (0.8 to 66 μ M), which are available in culture collections, is 1 to 3 orders of magnitude higher, and these common methanotrophs are not able to survive for a prolonged period using only atmospheric CH₄ (14, 17, 37). Recently, however, a type II methanotroph was isolated from a humisol that was able to adapt to nanomolar K_m values, close to those measured in upland soils (14; P. Dunfield, personal communication). The existence of this isolate brought into question the hypothesis of Bender and Conrad (6) that besides the common low-affinity methanotrophs (micromolar K_m), unknown high-affinity methanotrophs

(nanomolar K_m) exist and that only the latter are responsible for atmospheric CH₄ oxidation.

Common methanotrophs have a neutral pH optimum (18). However, most forest soils are slightly acidic, around pH 5 and lower. Bacteria extracted from forest soils showed a methanotrophy pH optimum of 5.8, indicating that unknown acidophilic methanotrophs may be responsible for CH₄ oxidation in forest soils (5). Indeed, an acidophilic methanotroph, belonging to the α proteobacteria and closely related to the nonmethanotroph *Bejerinckia* but only distantly related to the common type II methanotrophs, was recently isolated from an acidic blanket peat bog in Russia (11, 12).

However, so far little is known about the methanotrophic community in forest soil. A recent analysis of *pmoA* gene libraries from forest soils has demonstrated the existence of a new group of methanotrophs in various forest soils (23). These soils all exhibited uptake of atmospheric CH₄.

Forest soils have been extensively studied with respect to CH₄ oxidation kinetics and zonation and inhibition of CH₄ oxidation because of their important function as major sinks in the global CH₄ budget. The highest CH₄ oxidation activity in forest soils was usually measured in subsurface soil layers (1, 29, 33, 38). This localization of methanotrophs in deeper soil layers was attributed to inhibition of methanotrophs by ammonium or terpenes that are released or produced in the organic surface layers of the forest soil (2–4, 16, 26, 36). However, the zonation of CH₄ oxidation in relation to the involved methanotrophic community has not yet been studied.

Therefore, we measured vertical profiles of the uptake of atmospheric CH₄ in forest soil cores in winter and summer and characterized the bacterial and involved methanotrophic populations by PCR and denaturing gradient gel electrophoresis

* Corresponding author. Mailing address: Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie, Karl-von-Frisch-Strasse, 35043 Marburg, Germany. Phone: 49-6421-178801. Fax: 49-6421-178809. E-mail: conrad@mail.uni-marburg.de.

(DGGE) using a universal small-subunit rRNA gene (SSU rDNA) primer set and a primer set targeting the *pmoA* gene.

MATERIALS AND METHODS

Sampling site and soil characteristics. The sampling site was located on a slope in a deciduous forest near Marburg, Germany (N 51°00.000', E 09° 50.625'), consisting of mainly beech (*Fagus sylvatica*) and oak (*Quercus robur*). The soil type was a cambisol with a A_h (2 to 6 cm), B_v (6 to 28 cm), and C (sandstone) horizon. The soil originated on sandstone and was a loamy sand. The pH_{H_2O} values of the organic A_h horizon and the mineral subsoil were pH 3.8 and pH 4.3, respectively. Soil cores were collected in January (winter) and July (summer) of 1999.

The maximal water-holding capacity (WHC) was determined for the organic soil (A_h) and the mineral subsoil (B_v) by the method of Schlichting & Blume (35), and the values were 0.46 ± 0.04 and 0.39 ± 0.02 g of H_2O g (dry weight) of soil⁻¹ ($n = 5$), respectively (35). The gravimetric water content was determined for each 2-cm vertical soil section and expressed as a percentage of WHC.

Vertical CH_4 concentration profiles. Gas samples were taken by pushing a PEEK capillary (diameter, 0.35 mm; Sykam, Gilchingen, Germany) attached to a stainless steel rod into the soil at 1-cm intervals. Prior to sampling, the tube was flushed by extracting 0.1 ml of gas. Gas samples (1 ml) were collected in gastight syringes and analyzed by gas chromatography with a GC-8A (Shimadzu, Japan) equipped with a flame ionization detector and a stainless steel column (length, 2 m; diameter, 1/8 inch) filled with Poropak Q (80/110 mesh).

Collection of soil cores and in vitro CH_4 oxidation rate. Soil cores were taken with Plexiglas corers (diameter, 6 cm) pushed into the forest floor. The columns were extracted from the ground and closed with silicone stoppers. In the laboratory, the cores were gently pushed upward and cut into 2-cm sections. The sectioned soil layers were immediately transferred into 150-ml serum bottles, which were closed with latex stoppers.

Gas samples were repeatedly taken over time with gastight pressure-lock syringes (A-2 series; Dynatech, Baton Rouge, La.) and analyzed by gas chromatography. Apparent first-order CH_4 oxidation rate constants were calculated (Excel 7.0; Microsoft) from the exponential decrease of CH_4 with time and converted to CH_4 oxidation rates by multiplication with the atmospheric CH_4 mixing ratio (1.7 ppmv).

DNA extraction. DNA extraction from forest soil was modified from the method of Moré et al. (31). Approximately 0.5 g (fresh weight) of soil was taken from each forest soil layer (2 cm thick) and transferred into 2-ml screw cap tubes. Approximately 1 g of sterilized (170°C for 4 h) zirconia/silica beads (diameter, 0.1 mm; Biospec Products Inc., Bartlesville, Okla.), 800 μ l of 120 mM sodium phosphate buffer (pH 8), and 260 μ l of sodium dodecyl sulfate solution (10% sodium dodecyl sulfate, 0.5 M Tris-HCl [pH 8.0], 0.1 M NaCl) were added, and the soil was resuspended homogeneously by vortexing. The cells were lysed for 45 s by shaking in a cell disruptor (FP120 FastPrep; Savant Instruments Inc., Farmingdale, N.Y.) at a setting of 6.5 m s⁻¹. After centrifugation (3 min at 12,000 \times g), the supernatant was collected and the soil-bead mixture was extracted a second time by resuspension in 700 μ l of sodium phosphate buffer. Protein and debris were precipitated from the supernatant by adding 0.4 volume of 7.5 M ammonium acetate and incubating the mixture on ice for 5 min. After centrifugation at 12,000 \times g for 3 min, nucleic acids were precipitated by adding 0.7 volume of isopropanol and centrifuging the mixture at 12,000 \times g and 4°C for 45 min. Subsequently, the DNA pellet was washed with 70% ethanol at 4°C and dried under vacuum. Finally, DNA was resuspended in 200 μ l of Tris-EDTA buffer (10 mM Tris base, 1 mM EDTA [pH 8]).

Removal of humic acids. The forest soil DNA extracts were dark brown and contained large amounts of humic acids. The humic acids were removed with acid-washed polyvinyl-pyrrolidone (PVPP) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany) in spin columns (Bio-Rad, Munich, Germany) modified from the method of Holben et al. (21). The spin columns were filled with 2 ml of PVPP, which had been equilibrated and suspended in Tris-EDTA (pH 8). The PVPP columns were packed and dried by centrifugation (375 \times g for 1 min) just prior to loading. About 150 μ l of the brown humic acid-containing soil DNA extract was loaded onto the column and centrifuged. The purified DNA solution was clear and colorless and readily amplifiable by PCR.

The concentration and purity of the DNA solutions were determined by measurement of absorption at 260 and 280 nm, after 1:10 dilution in H_2O , using a GeneQuant spectrophotometer (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden). For PCR amplification, DNA aliquots at a standardized DNA concentration of 1 ng μ l⁻¹ were used.

PCR amplification. For PCR amplification, we used a universal SSU rRNA-based primer set, targeting all life, and the functional primer set *pmoA* (19).

PCR buffer (20 mM Tris-HCl [pH 8.3], 50 mM KCl), 1 U and 0.5 U of AmpliTaq DNA polymerase for the *pmoA* and the universal primer set, respectively (Perkin-Elmer Applied Biosystems, Weiterstadt, Germany), 0.5 μ M each primer, and 100 μ M each deoxynucleoside triphosphate (Amersham Life Science, Braunschweig, Germany) were added to a total reaction volume of 50 μ l at 4°C. For the *pmoA* amplification, MasterAmp 2 \times PCR premix F containing 100 mM Tris-HCl (pH 8.3), $MgCl_2$, 400 μ M each deoxynucleoside triphosphate, and the PCR enhancer betaine (Epicentre Technologies, Madison, Wis.) were added to the reaction solutions. The same template concentration (1 to 5 ng μ l⁻¹) was

always used in a set of PCR amplifications from the same soil core. Amplifications were started by placing cooled (4°C) PCR tubes immediately into the preheated (94°C) thermal block of a Mastercycler Gradient thermocycler (Eppendorf, Hamburg, Germany). The thermal cycling profiles consisted of touchdown programs with an initial denaturation of 3 min at 94°C followed by 30 cycles of 30 s at 94°C, 30 s at the annealing temperature, and 45 s at 72°C, with 5 min at 72°C for the last cycle. The annealing temperature decreased from 62 to 55°C and from 60 to 50°C in 0.5°C steps for the *pmoA* and universal primer sets, respectively.

Aliquots (5 μ l) of PCR products were analyzed by electrophoresis on 3% agarose gels, stained with ethidium bromide, and quantified densitometrically. The gels were destained in water for 30 min. For calibration, the Smart-Ladder DNA mass and size ruler (Eurogentec, Seraing, Belgium) was used (calibration coefficient of all analyses, $r > 0.9$). The gels were photographed with an imaging system (MWG Biotech, Ebersberg, Germany), and DNA bands were analyzed with RFLP-scan software (CSP Inc., Billerica, Belgium).

DGGE. DGGE was carried out as described previously in detail (19). PCR products were separated using a DCode System (Bio-Rad) on 1-mm-thick polyacrylamide gels (6.5% [wt/vol] acrylamide-bis acrylamide [37.5:1] [Bio-Rad]) prepared with and electrophoresed in 0.5 \times TAE (pH 7.4) (0.04 M Tris base, 0.02 M sodium acetate, 1 mM EDTA) at 60°C and constant voltage. A denaturing gradient of 35 to 80% and 35 to 70% was used for the *pmoA* and Universal PCR products, respectively. A denaturing gradient of 80% (vol/vol) denaturant corresponded to 6.5% acrylamide, 5.6 M urea, and 32% deionized formamide. The gels were poured onto GelBond PAG film (FMC Bioproducts, Rockland, Maine) to avoid gel distortion. The gels were stained with 1:50,000 (vol/vol) SYBR-Green I (Biozym, Hessisch-Oldendorf, Germany) for 30 min and scanned with a Storm 860 PhosphorImager (Molecular Dynamics, Sunnyvale, Calif.). The scanned DGGE gels were digitally enhanced with Photoshop 5.0 (Adobe Systems Inc.) to improve graphic resolution of the figures.

For further analysis, the DGGE bands were visualized in the SYBR Green I-stained gels with blue light ($\lambda > 400$ nm) using a Dark Reader transilluminator (Clare Chemical Research, Ross on Wye, United Kingdom). Individual DGGE bands were then excised, reamplified, and reanalyzed by DGGE to verify band purity, as described recently (19).

Sequencing of DGGE bands. Reamplified PCR products of excised DGGE bands were purified using the EasyPure DNA purification kit (Biozym, Hessisch-Oldendorf, Germany). The concentration and purity of the PCR products were determined by measuring the absorption at 260 and 280 nm of a 1:20 dilution in H_2O with a GeneQuant spectrophotometer (Pharmacia Biotech). Sequencing reactions were performed using the ABI Dye Terminator cycle-sequencing kit (Perkin-Elmer Applied Biosystems) as specified by the manufacturer. Cycle-sequencing products were purified from excess dye terminators and primers using Microspin G-50 columns (Pharmacia Biotech, Freiburg, Germany) and analyzed with an ABI 373 DNA sequencer (Perkin-Elmer Applied Biosystems).

Sequences were analyzed using the Lasergene software package (DNASTAR, Madison, Wis.). The nucleotide and inferred amino acid sequences of the gene fragments of *pmoA* were manually aligned with sequences retrieved from the GenBank database. SSU rDNA sequences were aligned and phylogenetically placed with the ARB software package (<http://www.biol.chemie.tu-muenchen.de/pub/ARB>). The partial SSU rDNA sequences were added to a validated and optimized tree of complete 16S rDNA sequences while keeping the overall topology constant (30). On the nucleic acid level, evolutionary distances between pairs of sequences were calculated by using the Jukes-Cantor and Felsenstein equations (15, 25) provided in the ARB package. Phylogenetic trees were constructed by using distance matrix and maximum-parsimony methods supplied by the ARB software package.

Nucleotide accession numbers. The sequences of *pmoA* gene fragments and of the SSU rDNA fragments of excised DGGE bands have been deposited in GenBank under accession numbers AF200726 to AF200729 and AF200730 to AF200734, respectively.

RESULTS

CH_4 consumption rates by forest soil. In situ CH_4 mixing ratios decreased with soil depth both in winter and in summer (Fig. 1). In winter, the CH_4 mixing ratios showed a quasi-linear decrease with soil depth (Fig. 1A). The scattering of the data was too large to determine the zone of CH_4 oxidation with certainty, but it was probably at the lower end of the profile. In summer, the in situ profile showed a quasi-linear decrease in CH_4 mixing ratios from 0 to about 8 cm deep (Fig. 1B). Below 16 cm deep, the in situ CH_4 mixing ratios remained constant at approximately 0.25 ppmv CH_4 . The shape of the vertical CH_4 profile indicated CH_4 oxidation at about 8 to 15 cm deep. The forest soil was always a net sink for atmospheric CH_4 , exhibiting a CH_4 consumption rate of 1.00 ± 0.26 mg m⁻² day⁻¹

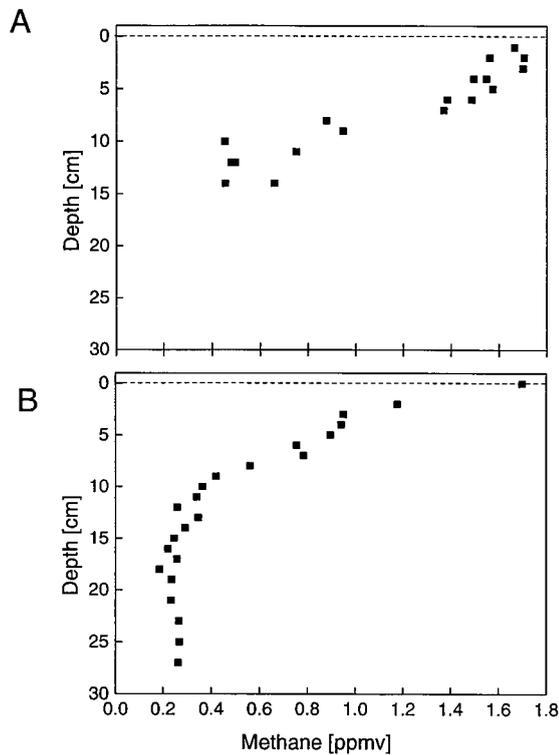


FIG. 1. Vertical profiles of in situ CH_4 mixing ratios in forest soil in winter (January 1999) (A) and in summer (July 1999) (B).

(mean \pm standard deviation [SD] of three determinations) in winter. Similar values were reported previously (1, 29, 38).

The in vitro CH_4 oxidation rates were measured in distinct 2-cm soil sections between 0 and 16 cm deep in winter and 0 and 28 cm deep in summer (Fig. 2A). In winter, no CH_4 consumption was detected between 0 and 6 cm deep. CH_4 oxidation started at 6 cm deep, and maximal oxidation rates were measured between 10 and 14 cm deep. The oxidation rates sharply decreased below 14 cm deep. The activity-depth profiles had the same shape in two replicate cores taken from the same site, but the magnitude of the CH_4 oxidation rates differed among the three replicates by a factor of <4 (data not shown). In summer, CH_4 oxidation activity was detected between 0 and 26 cm deep. Maximal oxidation rates were measured between 4 and 10 cm deep; the CH_4 oxidation rates decreased sharply below 12 cm deep and ceased below 26 cm. The activity was measured in triplicate aliquots taken from the same soil core (Fig. 2A). The coefficient of variation of the rates measured in the individual soil sections was between 4 and 22%.

The water content of the loamy sand decreased with depth. In winter, the water content exceeded 100% WHC between 0 and 10 cm deep and dropped to about 50% WHC below 12 cm deep. In summer, the forest soil exhibited a water content of approximately 70% WHC at the surface (0 to 2 cm), decreasing to approximately 13% WHC below 26 cm deep (Fig. 2B).

DNA extraction and PCR amplification. The same soil core sections that were used for measurement of the CH_4 oxidation activity shown in Fig. 2 were also used for DNA extraction. Up to 10 times more total DNA was extracted from the forest soil in summer than in winter (Fig. 3A). The total extractable DNA content of the soil decreased with depth, both in winter and in summer, but the decrease was more pronounced in summer (Fig. 3A).

PCR with the universal primer set, targeting the SSU rDNA of all life, amplified PCR products from all depth layers in winter ($25.7 \pm 4.9 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$ [mean \pm SD of 8 determinations]) and summer ($29.5 \pm 11.5 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$ [mean \pm SD of 13 determinations]) at similar concentrations, indicating that DNA from all soil layers was readily amplifiable and was not subjected to different biases caused by humic acids or other PCR-inhibiting substances.

In contrast to the universal primer set, PCR with the primer set *pmoA* yielded product concentrations depending on the soil depth and season. In winter, *pmoA* was detected only in a well-defined layer between 6 and 16 cm deep, with the highest PCR product yield being found between 14 and 16 cm deep (Fig. 3B). No *pmoA* was detected in the top 6 cm of soil. In summer, on the other hand, *pmoA* was detected and amplified between 0 and 28 cm deep, with the highest PCR product yield being found between 6 and 8 cm deep (Fig. 3B). The *pmoA* gene was detected only in soil layers with CH_4 oxidation activity, indicating that the presence of the *pmoA* gene, and thus of methanotrophs, coincided with the measured activity (Fig. 2A and 3B).

SSU rDNA DGGE community pattern. The DGGE analysis of PCR products amplified with the universal primer set was conducted only in winter (in soil from 0 to 16 cm deep) and revealed a complex banding pattern, reflecting the high microbial diversity expected for forest soil (Fig. 4A). The number and intensity of DGGE bands increased below a soil depth of 2 cm. The DGGE banding pattern changed at different soil depths, indicating changes of the bacterial community struc-

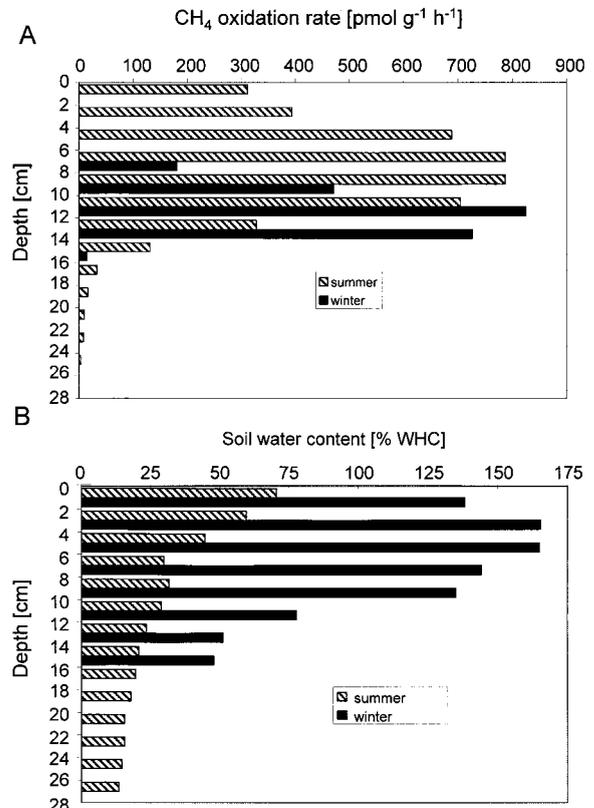


FIG. 2. Vertical profiles of CH_4 oxidation rates per gram of fresh soil (A) and soil water content (B) in winter and summer. The CH_4 oxidation rates in winter are from single measurements, whereas those in summer are means of triplicates (coefficient of variation = 4 to 22%).

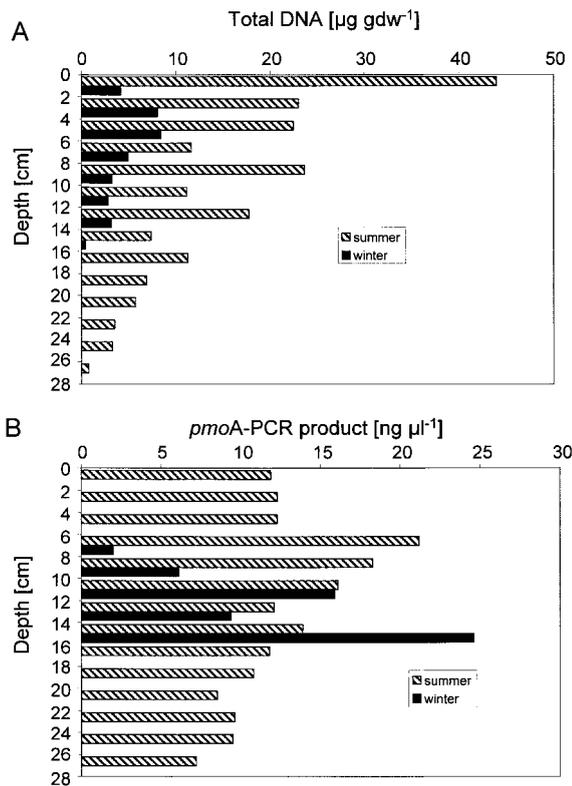


FIG. 3. Vertical profiles of the total extractable DNA content per gram of dry soil (A) and the *pmoA* concentration of the PCR products from each soil section (B) in winter and summer. In winter, DNA was analyzed only between 0 and 16 cm deep; no *pmoA* was detected between 0 and 6 cm deep.

ture with depth. The intensity of the DGGE bands indicated the presence of about 11 dominant populations within the layer of highest diversity (6 to 10 cm deep). Sequence analysis of five major DGGE bands revealed two populations [MR(UNI)4 and MR(UNI)5] grouping within the phylum of high-GC gram-positive bacteria, two populations [MR(UNI)1 and MR(UNI)3] closely related to the phylum *Holophaga-Acidobacterium*, and one population [MR(UNI)2] grouping within the α proteobacteria (Fig. 4B). The latter population [MR(UNI)2] was the most closely related to clones ms14, ms6, and ms10, which were retrieved from a peat bog with primers specific for methanotrophs (accession numbers AF111789, AF111787, and AF111788) (I. McDonald and C. Murrell, personal communication).

***pmoA* DGGE community pattern.** The DGGE analysis of PCR products amplified with the *pmoA* primer set was performed on soil samples taken in winter (0 to 16 cm deep) and in summer (0 to 28 cm deep). In winter, DGGE bands of *pmoA* products were detected between 6 and 16 cm deep, and the number of DGGE bands increased from one to six between 6 and 16 cm deep (Fig. 5A). In the soil layer (10 to 12 cm deep) with the highest CH_4 oxidation rates, the DGGE bands MR2, MR3, MR4, and MR5 were the most intense.

In summer, DGGE bands of *pmoA* were detected between 0 and 28 cm deep. The number of DGGE bands increased from one to six between 0 and 16 cm deep, and then decreased again to only one band below 24 cm deep. The soil layers with maximal CH_4 oxidation activity (4 to 12 cm deep) (Fig. 2A) coincided with those showing the highest PCR product yield of *pmoA* (6 to 12 cm deep) (Fig. 3B) and those with the most

intense DGGE bands (MR2, MR3, and MR5) (6 to 12 cm deep) (Fig. 5B). The band for MR2 was present in all the layers, indicating that MR2 was the most dominant and widely distributed methanotrophic population. The band for MR4 was most intense at 12 to 24 cm deep (Fig. 5B). The band for MR1 appeared only below 14 cm deep, both in winter and in summer.

Sequence analysis was performed with the DGGE bands MR1 to MR5 (Fig. 6). DGGE band MR1 grouped among the β proteobacteria and was closely related to the ammonium-oxidizing genus *Nitrosospira*. DGGE bands MR2 to MR5 formed a distinct group of methanotrophs distantly related to common type II methanotrophs (α proteobacteria). These sequences were very similar and clustered with *pmoA* clone sequences (Rold 1, 3, and 5; Maine 6, 8, and RA14) recently retrieved from other forest soils (23).

DISCUSSION

Atmospheric CH_4 oxidation has been extensively studied in various upland soils. However, little is known about the methanotrophic community involved. By studying the vertical distribution of both the oxidation of atmospheric CH_4 and the molecular characteristics of methanotrophic populations in an acidic forest soil, we detected a methanotrophic community distinct from known type I and II methanotrophs and occurring only in the soil layers which were actively oxidizing atmospheric CH_4 . The *pmoA* sequences of this methanotrophic community clustered distantly from the known methanotrophs and grouped with *pmoA* clone sequences recently retrieved from other forest soils involved in atmospheric CH_4 consumption (23).

The forest soil examined in this study consumed atmospheric CH_4 at all times. The soil showed a quasi-linear decrease of CH_4 with depth, and, as reported for other forest soils, maximal CH_4 consumption occurred in subsurface soil layers (1, 29, 33, 38). In winter, no CH_4 consumption was measured in the surface layer (0 to 6 cm deep) and no methanotrophs were detected by DGGE with *pmoA*. One reason for the missing CH_4 consumption might be the high water content in winter, which exceeded saturation (>100% WHC). Methane was not produced in the soil, in contrast to observations in other upland soils (13, 28). Therefore, atmospheric rather than endogenously produced CH_4 was the only substrate for CH_4 -oxidizing bacteria in this forest soil.

The inhibition of CH_4 oxidation in surface soil was often attributed to high NH_4^+ concentrations (16, 26, 36). The primer set *pmoA* also amplifies the *amoA* gene of ammonium oxidizers coding for the α subunit of ammonium monooxygenase (22). In this forest soil population, MR1, closely related to *Nitrosospira*, was detected below the maximal CH_4 consumption zone, while no ammonium oxidizers were detected near the surface. The presence of ammonium oxidizers below the soil layer of maximal CH_4 oxidation activity raised the question whether ammonium oxidizers were sustained by nitrification. However, the NH_4^+ concentrations were not inhibitory to the methanotrophs. Recently, NH_4^+ was actually identified as a prerequisite for CH_4 oxidation in rice field soil (8).

The increase of total extractable DNA indicated a stimulation and proliferation of all life from January (winter) to July (summer). However, while the total DNA concentration decreased with depth, the *pmoA* PCR product concentration and the number of methanotrophic populations (i.e., the number of DGGE bands) increased. The methanotrophic community expanded its presence from a well-defined subsurface layer in winter

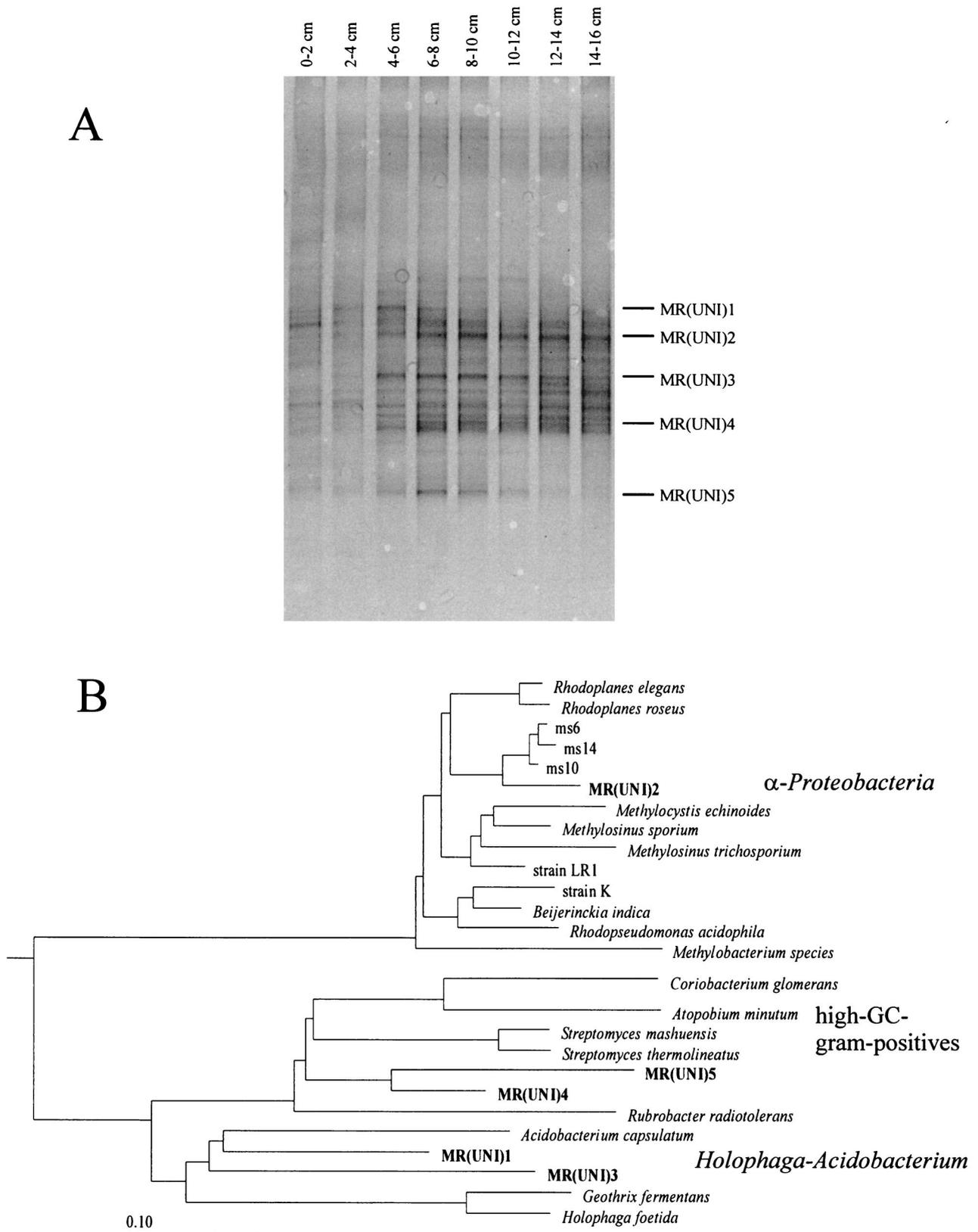


FIG. 4. (A) DGGE pattern obtained with the universal SSU rDNA primer set. (B) Phylogenetic tree constructed with partial 16S rDNA sequences of the marked DGGE bands from the forest soil core sampled in winter. The phylogenetic tree shows the relationships of the marked DGGE bands to members of the domain *Bacteria*. The scale bar indicates the estimated number of base changes per nucleotide sequence position; the following 16S rDNA sequences (accession numbers) were taken from data banks: ms6, ms10, and ms14 are clones from a peat bog retrieved with primers specific for methanotrophs (AF111789, AF111787, and AF111788); strain LR1 is a high-affinity type II methanotroph (Y18442); strain K is an acidophilic methanotroph (Y17144).

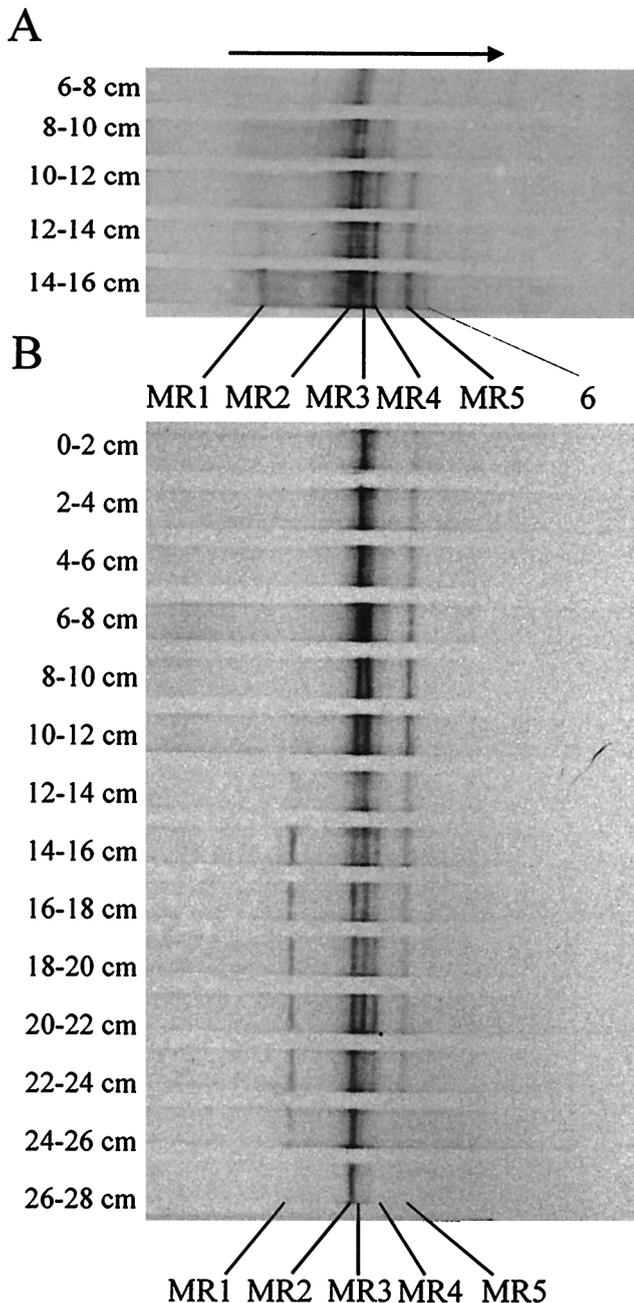


FIG. 5. DGGE pattern obtained with the *pmoA* primer set targeting the gene of the α subunit of particulate methane monooxygenase in winter (A) and in summer (B). The arrow shows the direction of increasing denaturant and electric field. Bands MR1 to MR5 were sequenced; band 6 was not sequenced.

to the entire soil core in summer. It should be noted, however, that the presence of these populations does not necessarily mean that they were active. The MR2 band was present in all depth layers, indicating that MR2 was the most widely distributed methanotrophic population. In the soil layers with highest CH_4 oxidation activity, populations MR2, MR3, and MR5 were prevalent over MR4, whereas MR4 and the putative ammonium oxidizer MR1 appeared in the soil layers below those with the maximal oxidation activity. This indicated that the methanotrophic populations were probably adapted to the conditions at a particular depth, each occupying its own eco-

logical niche. The DGGE community pattern itself and the sequences detected were the same in winter and summer.

The most frequently detected bacteria of the forest soil bacterial community belong to the phyla *Holophaga-Acidobacterium*, high-GC gram-positive bacteria, and α proteobacteria. The α proteobacteria DGGE band appeared only in soil layers with CH_4 consumption and was most closely related to clone sequences (ms10, ms8, and ms14) retrieved with primers specific for methanotrophs from a peat bog (McDonald and Murrell, personal communication). However, there is no direct evidence that any of the populations detected by 16S rDNA-based DGGE indeed belonged to the methanotrophs. These SSU rDNA sequences, as well as the *pmoA* sequences, were distantly related to type II methanotrophs. Recently, phospholipid fatty acid (PLFA) analysis and sequence comparison of *pmoA* in various soils also indicated novel methanotrophs distantly related to type II methanotrophs and α proteobacteria (23). Although, the correspondence between SSU rDNA and *pmoA* data might be coincidental, it allows the hypothesis that the α proteobacteria population detected with the universal primer set and the methanotrophic populations detected with the *pmoA* primer set are the same. The α proteobacteria population belonged to the most abundant bacteria in soil layers with CH_4 oxidation. The novel sequences obtained by *pmoA* PCR and DGGE were found in the same soil layers. Finally, cloning results in other forest soils indicated that the same novel *pmoA* sequences were ubiquitously distributed in forest soils (23).

Process data and kinetic properties of CH_4 consumption have repeatedly suggested that novel methanotrophs are responsible for atmospheric CH_4 consumption (5, 6, 33). The novel *pmoA* sequences strongly support the existence of yet unknown methanotrophs involved in atmospheric CH_4 consumption, as postulated by Bender and Conrad (6). Radioactive labeling studies showed that high-affinity methanotrophs in forest soils contain unusual i17:0, a17:0 and 17:1 ω 8c PLFAs whereas known methanotrophs contain 18:1 ω 8c and 16:1 ω 8c PLFAs (34).

Enrichments with high CH_4 concentrations have resulted in the isolation of common methanotrophs from neutral environments. Molecular data from neutral soils and at high CH_4 concentrations demonstrate the presence of common type I and II methanotrophs (19, 24, 32). A novel methanotrophic strain, S6, closely related to the genus *Beijerinckia*, was isolated from an acidic blanket peat, also by using high CH_4 concentrations (12). It is unknown whether this strain, which contains only a soluble methane monooxygenase (sMMO), is able to oxidize CH_4 with high affinity (nanomolar K_m). However, enrichments under low CH_4 concentrations resulted in the isolation of the high-affinity type II methanotrophic strain LR1 from neutral soil (14).

In summary, all these observations suggest that known type I and II methanotrophs prevail in neutral environments, preferentially at high CH_4 concentrations, but are able to adapt to high-affinity kinetics (type II methanotrophs). However, unknown high-affinity methanotrophs seem to prevail in acidic environments where atmospheric CH_4 is oxidized. The missing link in the information is the isolation of a bacterium that combines all the molecular evidence, including unusual *pmoA* sequence and PLFA pattern, with high-affinity CH_4 oxidation kinetics. Forest soils tend to be acidic, and the unknown, high-affinity methanotrophs seem to thrive at a low pH and might therefore have escaped isolation in neutral media (5, 11). This new knowledge about the wide distribution of novel acidophilic methanotrophs in forest soil, together with the molecu-

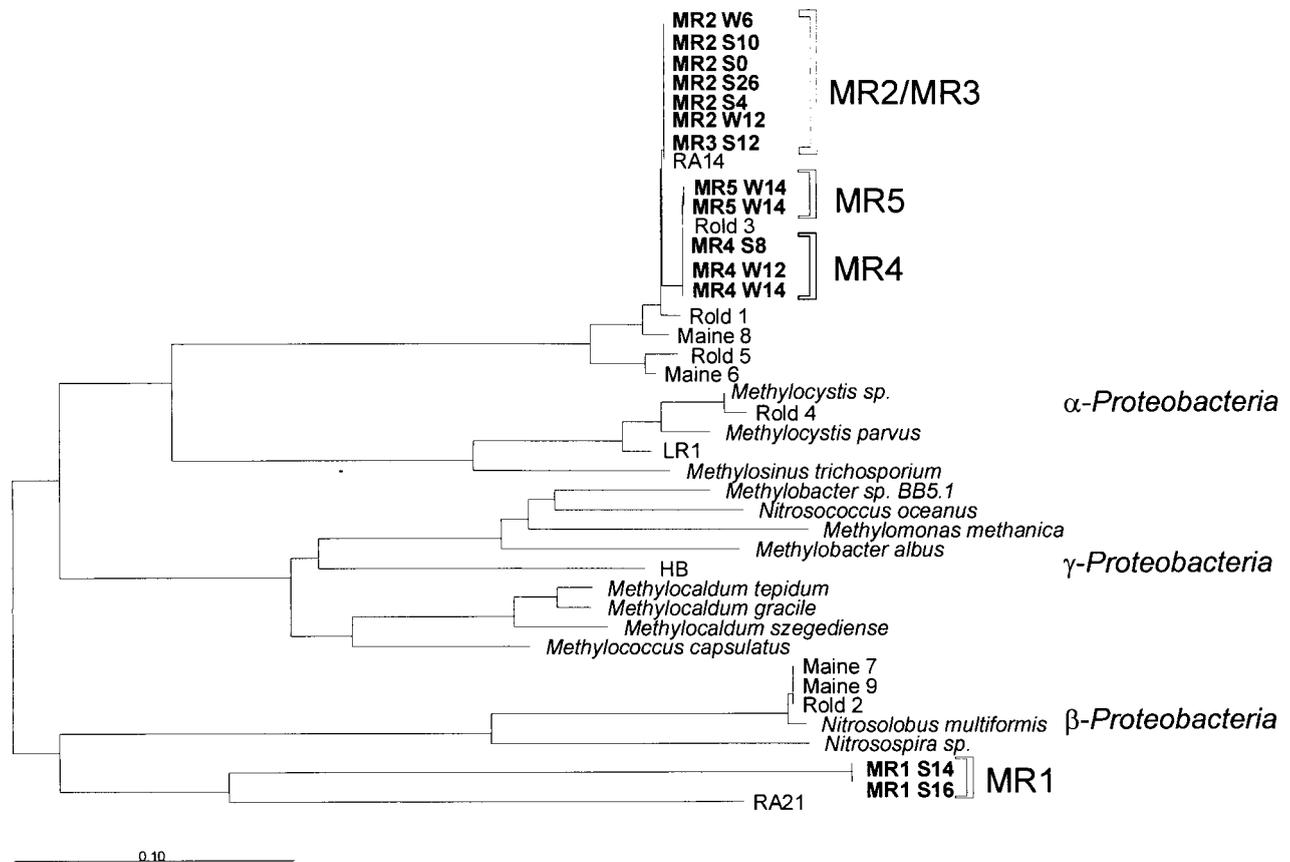


FIG. 6. Phylogenetic tree based on the derived amino acid sequences of *pmoA* and *amoA* fragments, showing the relation of the *pmoA* sequences (MR1 to MR5) retrieved from forest soil to *pmoA* and *amoA* sequences of other methanotrophs and ammonium oxidizers. Bands of the same electrophoretic mobility were repeatedly sequenced from different DGGE gels and lanes (soil depths) to prove sequence identity. Sequences were labeled according to the DGGE band position (MR1 to MR5), the season of sampling (W, winter; S, summer), and the soil depth (in centimeters). The scale bar indicates the estimated number of changes per amino acid sequence position. The *pmoA* sequences Rold, Maine, and RA are novel *pmoA* sequences retrieved from forest soils (23); LR1 is a high-affinity type II methanotroph (Y18443); and HB is a thermophilic methanotroph (U89302).

lar tools at hand, should facilitate the enrichment and isolation of the bacterium which constitutes the missing link.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Bianca Wagner, Sonja Fleissner, and Axel Fey for excellent technical assistance.

This work was supported by grant BIO-4-CT-960419 from the European Commission.

REFERENCES

- Adamsen, A. P. S., and G. M. King. 1993. Methane consumption in temperate and subarctic forest soils—rates, vertical zonation, and responses to water and nitrogen. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**:485–490.
- Amaral, J. A., and R. Knowles. 1997. Inhibition of methane consumption in forest soils and pure cultures of methanotrophs by aqueous forest soil extracts. *Soil Biol. Biochem.* **29**:1713–1720.
- Amaral, J. A., and R. Knowles. 1998. Inhibition of methane consumption in forest soils by monoterpenes. *J. Chem. Ecol.* **24**:723–734.
- Amaral, J. A., A. Ekins, S. R. Richards, and R. Knowles. 1998. Effect of selected monoterpenes on methane oxidation, denitrification, and aerobic metabolism by bacteria in pure culture. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:520–525.
- Amaral, J. A., T. Ren, and R. Knowles. 1998. Atmospheric methane consumption by forest soils and extracted bacteria at different pH values. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:2397–2402.
- Bender, M., and R. Conrad. 1992. Kinetics of CH_4 oxidation in oxic soils exposed to ambient air or high CH_4 mixing ratios. *FEMS Microbiol. Ecol.* **101**:261–270.
- Benstead, J., and G. M. King. 1997. Response of methanotrophic activity in forest soil to methane availability. *FEMS Microbiol. Ecol.* **23**:333–340.
- Bodelier, P. L. E., P. Roslev, T. Henckel, and P. Frenzel. 2000. Stimulation of methane oxidation by ammonium-based fertilizers around rice roots. *Nature* **403**:421–424.
- Cicerone, R. J., and R. S. Oremland. 1988. Biogeochemical aspects of atmospheric methane. *Global Biogeochem. Cycles* **2**:299–327.
- Crutzen, P. J. 1991. Methane's sinks and sources. *Nature* **350**:380–381.
- Dedysh, S. N., N. S. Panikov, and J. M. Tiedje. 1998. Acidophilic methanotrophic communities from sphagnum peat bogs. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:922–929.
- Dedysh, S. N., N. S. Panikov, W. Liesack, R. Grosskopf, J. Z. Zhou, and J. M. Tiedje. 1998. Isolation of acidophilic methane-oxidizing bacteria from northern peat wetlands. *Science* **282**:281–284.
- Dunfield, P., and R. Knowles. 1995. Kinetics of inhibition of methane oxidation by nitrate, nitrite, and ammonium in a humisol. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**:3129–3135.
- Dunfield, P. F., W. Liesack, T. Henckel, R. Knowles, and R. Conrad. 1999. High-affinity methane oxidation by a soil enrichment culture containing a type II methanotroph. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:1009–1014.
- Felsenstein, J. 1993. PHYLIP: phylogeny inference package. University of Washington, Seattle.
- Gulledge, J., and J. P. Schimel. 1998. Low-concentration kinetics of atmospheric CH_4 oxidation in soil and mechanism of NH_4^+ inhibition. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:4291–4298.
- Gulledge, J., P. A. Steudler, and J. P. Schimel. 1998. Effect of CH_4 -starvation on atmospheric CH_4 oxidizers in taiga and temperate forest soils. *Soil Biol. Biochem.* **30**:1463–1467.
- Hanson, R. S., and T. E. Hanson. 1996. Methanotrophic bacteria. *Microbiol. Rev.* **60**:439.
- Henckel, T., M. Friedrich, and R. Conrad. 1999. Molecular analyses of the methane-oxidizing microbial community in rice field soil by targeting the genes of the 16S rRNA, particulate methane monooxygenase, and methanol

- dehydrogenase. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:1980–1990.
20. **Heyer, J.** 1990. *Der Kreislauf des Methans*. Mikrobiologie, Ökologie, Nutzung. Akademie-Verlag, Berlin, Germany.
 21. **Holben, W. E., J. K. Jansson, B. K. Chelm, and J. M. Tiedje.** 1988. DNA probe method for the detection of specific microorganisms in the soil bacterial community. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**:703–711.
 22. **Holmes, A. J., A. Costello, M. E. Lidstrom, and J. C. Murrell.** 1995. Evidence that particulate methane monooxygenase and ammonia monooxygenase may be evolutionarily related. *FEMS Microbiol. Lett.* **132**:203–208.
 23. **Holmes, A. J., P. Roslev, I. R. McDonald, N. Iversen, K. Henriksen, and J. C. Murrell.** 1999. Characterization of methanotrophic bacterial populations in soils showing atmospheric methane uptake. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:3312–3318.
 24. **Jensen, S., L. Oevreas, F. L. Daae, and V. Torsvik.** 1998. Diversity in methane enrichments from agricultural soil revealed by DGGE separation of PCR amplified 16S rDNA fragments. *FEMS Microbiol. Ecol.* **26**:17–26.
 25. **Jukes, T. H., and C. R. Cantor.** 1969. Evolution of protein molecules, p. 21–132. *In* H. N. Munro (ed.), *Mammalian protein metabolism*, vol. 3. Academic Press, Inc., New York, N.Y.
 26. **King, G. M., and S. Schnell.** 1994. Ammonium and nitrite inhibition of methane oxidation by *Methylobacter albus* BG8 and *Methylosinus trichosporium* OB3b at low methane concentrations. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**:3508–3513.
 27. **King, S. L., P. D. Quay, and J. M. Landsdown.** 1989. The ¹²C/¹³C kinetic isotope effect for soil oxidation of methane at ambient atmospheric concentrations. *J. Geophys. Res.* **94**:18273–18277.
 28. **Klemedtsson, A. K., and L. Klemedtsson.** 1997. Methane uptake in swedish forest soil in relation to liming and extra N-deposition. *Biol. Fertil. Soils* **25**:296–301.
 29. **Koschorreck, M., and R. Conrad.** 1993. Oxidation of atmospheric methane in soil: measurements in the field, in soil cores and in soil samples. *Global Biogeochem. Cycles* **7**:109–121.
 30. **Ludwig, W., O. Strunk, S. Klugbauer, N. Klugbauer, M. Weizenegger, J. Neumaier, M. Bachleitner, and K. H. Schleifer.** 1998. Bacterial phylogeny based on comparative sequence analysis. *Electrophoresis* **19**:554–568.
 31. **Moré, M. I., J. B. Herrick, M. C. Silva, W. C. Ghiorse, and E. L. Madsen.** 1994. Quantitative cell lysis of indigenous microorganisms and rapid extraction of microbial DNA from sediment. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**:1572–1580.
 32. **Oevreas, L., S. Jensen, F. L. Daae, and V. Torsvik.** 1998. Microbial community changes in a perturbed agricultural soil investigated by molecular and physiological approaches. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:2739–2742.
 33. **Roslev, P., N. Iversen, and K. Henriksen.** 1997. Oxidation and assimilation of atmospheric methane by soil methane oxidizers. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:874–880.
 34. **Roslev, P., and N. Iversen.** 1999. Radioactive fingerprinting of microorganisms that oxidize atmospheric methane in different soils. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:4064–4070.
 35. **Schlichting, E., and H. P. Blume.** 1966. *Bodenkundliches Praktikum*. Verlag Paul Parey, Hamburg, Germany.
 36. **Schnell, S., and G. M. King.** 1994. Mechanistic analysis of ammonium inhibition of atmospheric methane consumption in forest soils. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**:3514–3521.
 37. **Schnell, S., and G. M. King.** 1995. Stability of methane oxidation capacity to variations in methane and nutrient concentrations. *FEMS Microbiol. Ecol.* **17**:285–294.
 38. **Whalen, S. C., W. S. Reebergh, and V. A. Barber.** 1992. Oxidation of methane in boreal forest soils—a comparison of 7 measures. *Biogeochemistry* **16**:181–211.



Vertical distribution of the methanotrophic community after drainage of rice field soil

Thilo Henckel, Udo Jäckel, Ralf Conrad *

Max-Planck-Institute for Terrestrial Microbiology, Karl-von-Frisch-Strasse, D-35043 Marburg, Germany

Received 5 June 2000; received in revised form 4 October 2000; accepted 5 October 2000

Abstract

Anoxic soils, such as flooded rice fields, are major sources of the greenhouse gas CH₄ while oxic upland soils are major sinks of atmospheric CH₄. Nevertheless, CH₄ is also consumed in rice fields where up to 90% of the produced CH₄ is oxidized in a narrow oxic zone around the rice roots and in the soil surface layer before it escapes into the atmosphere. After 1 day drainage of rice field soil, CH₄ oxidation was detected in the top 2-mm soil layers, but after 8 days drainage the zone of CH₄ oxidation extended to 8 mm depth. Simultaneously, the potential for CH₄ production decreased, but some production was still detectable after 8 days drainage throughout the soil profile. The vertical distribution of the methanotrophic community was also monitored after 1 and 8 days drainage using denaturing gradient gel electrophoresis after PCR amplification with primer sets targeting two regions on the 16S rRNA gene that are relatively specific for methylotrophic α - and γ -*Proteobacteria*, and targeting two functional genes encoding subunits of key enzymes in all methanotrophs, i.e. the genes for the particulate methane monooxygenase (*pmoA*) and the methanol dehydrogenase (*mxhF*). Drainage stimulated the methanotrophic community. Eight days after drainage, new methanotrophic populations appeared and a distinct methanotrophic community developed. The population structure of type I and II methanotrophs was differently affected by drainage. Type II methanotrophs (α -*Proteobacteria*) were present throughout the soil core directly after drainage (1 day), and the community composition remained largely unchanged with depth. Only two new type II populations appeared after 8 days of drainage. Drainage had a more pronounced impact on the type I methanotrophic community (γ -*Proteobacteria*). Type I populations were not or only weakly detected 1 day after drainage. However, after 8 days of drainage, a large diversity of type I methanotrophs were detected, although they were not evenly distributed throughout the soil core but dominated at different depths. A distinct type I community structure had developed within each soil section between 0 and 20 mm soil depth, indicating the widening of suitable habitats for methanotrophs in the rice field soil within 1 week of drainage. © 2001 Federation of European Microbiological Societies. Published by Elsevier Science B.V. All rights reserved.

Keywords: Methane oxidation; Distribution; Vertical zonation; Methanotrophic community; Drainage; Rice field soil

1. Introduction

Flooded rice fields are a major source of the greenhouse gas CH₄, thus contributing to global warming. The atmospheric CH₄ concentration (1.8 ppmv) has more than doubled during the last 200 years [1]. Although more than 90% of the CH₄ production is of biogenic origin, produced by anaerobic methanogenic archaea, the source strength is directly influenced by anthropogenic activity, such as by growing wetland rice [1]. About 80% of the rice harvest is grown under the more productive flooded conditions (wetland rice) which produce about 25–60 Tg CH₄ year⁻¹ [1,2]. The estimated increase in demand for

rice by the year 2020 of 65% calls for the development of strategies to reduce and control CH₄ emissions from wetland rice [2]. Hence, basic knowledge of the underlying processes is essential.

One strategy to mitigate CH₄ emission is short intermittent drainage of the flooded fields [3,4]. Methanogenesis not only stops immediately after anoxic reduced soil is drained or aerated, but in addition is suppressed after re-flooding for a prolonged period, since aeration of the soil during drainage results in the regeneration of electron acceptors such as Fe³⁺ and SO₄²⁻ which then suppress CH₄ production [5–8].

In flooded rice fields methane oxidation is also an important regulator of CH₄ emission. Of the produced CH₄ about 30–90% is oxidized in the upper 2-mm oxic surface layer or in the oxic rhizosphere and thus is not emitted into the atmosphere [9–14]. Oxygen is a prerequisite for

* Corresponding author. Tel.: +49 (6421) 178801;
Fax: +49 (6421) 178809; E-mail: conrad@mail.uni-marburg.de

CH₄ oxidation. In non-saturated or aerated rice field soil, CH₄ mixing ratios > 500 ppmv are readily consumed by methanotrophs [15]. Both type I and II methanotrophs are present and active in rice field soils [16,17]. In wetland soils, CH₄, O₂ and NH₄⁺ are proximal factors controlling CH₄ oxidation [18]. In rice field soil, especially CH₄ and NH₄⁺ availability were shown as the key factors influencing methanotrophic community structure and activity [17,19]. Under certain conditions, even low atmospheric CH₄ concentrations (1.8 ppmv) can be oxidized by samples of rice field soil [20–22].

In flooded rice field soil, methanotrophic activity is confined to a very narrow zone at the oxic/anoxic interfaces, serving as a filter for CH₄. Drainage alters soil conditions dramatically and may affect the distribution and composition of the methanotrophic community, thus influencing CH₄ uptake. We therefore characterized the vertical distribution of the methanotrophic population structure during drainage of rice field soil cores.

2. Materials and methods

2.1. Incubation of the rice field soil cores

Air-dried and sieved (2 mm) rice field soil from Vercelli (Italy) was filled in polyethylene boxes (10×20×10 cm) to a height of 7 cm. Four boxes (unplanted microcosms) were submerged in a water-filled container (80×40×20 cm) and incubated in a greenhouse under day (16 h)–night (8 h) alternation for 6 weeks at a soil temperature of about 25°C [19], similar to field conditions in Vercelli.

The microcosms were taken out of the water and drained through 6-mm holes in the bottom of the microcosm under greenhouse conditions. One day after drainage, five soil cores were taken from two soil microcosms with a corer (diameter = 6 cm). Eight days later, five cores were taken from the remaining two microcosms. At each time point, one core was collected to determine potential methane production, three cores were used to measure methane oxidation activity and soil moisture content, and the fifth core (diameter = 1.6 cm) was immediately frozen at –20°C and sectioned for molecular analysis of the microbial community. This core was taken from the microcosm in which one replicate of the methane oxidation activity was assayed. The soil had a maximum water-holding capacity (whc) corresponding to a gravimetric water content of 44% (w/w).

2.2. Methane oxidation and production

The soil cores were sectioned by pushing the soil out of the corer and cutting it with a thin wire; the first 1-cm layer into five 2-mm soil sections, the next 2–4-cm layer into four 5-mm sections, and the last 4–5 cm-layer into one 1-cm sections. Soil sections were transferred into 150-

ml glass flasks, closed with latex stoppers and incubated at 25°C. The oxidation of CH₄ was measured by repeatedly taking gas samples from the headspace initially containing ambient CH₄ mixing ratios (about 1.75 ppmv). Ambient concentrations were chosen to make the incubation time as short as possible (usually 2 days) and also to assess the ability of the soil to act as a sink of atmospheric CH₄. Methane was analyzed by gas chromatography using a flame ionization detector. Methane oxidation rate constants were determined by exponential curve fitting (Origin 5.0, Microcal), and CH₄ oxidation rates were calculated by multiplying the rate constants with a CH₄ concentration of 1.75 ppmv (ambient CH₄ mixing ratio). Potential CH₄ production was determined analogously, by incubating the soil sections under N₂ (< 3 days) and measuring the increase of CH₄ with time. Production rates of CH₄ were calculated by linear regression analysis. Rates are given per gram dry weight of soil.

2.3. DNA extraction

One rice soil core at each time point was sectioned into 300-µm layers using a microtome at –20°C. Six soil sections within a '2-mm' soil interval were combined and mixed. The soil sections connecting two soil layer intervals (i.e. 1800–2100 µm, 2900–3100 µm, etc.) were not used to prevent cross-detection of organisms across the distinct depth layers. DNA extraction from rice field soil and from pure cultures of methanotrophs, modified after Moré et al., was described in detail by Henckel et al. [16,23].

2.4. PCR amplification

For PCR amplification we used two 16S rRNA-based primer sets modified and adapted for use in denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) [16,24–26], the primer sets 'MB10γ' and 'MB9α', targeting methylotrophic γ- and α-*Proteobacteria*, respectively. Further, two functional primer sets were used, 'pmoA' and 'mxaF', targeting the genes encoding subunits of the particulate methane monooxygenase (pMMO) and the methanol dehydrogenase (MDH), key enzymes present in all methanotrophs [16,24–26]. All used primer pairs had a GC clamp attached to the 5' end of the forward or reverse primer for subsequent DGGE analysis [16]. The primers and the PCR conditions for each primer pair are summarized in Table 1. PCR buffer (20 mM Tris–HCl, pH 8.3, 50 mM KCl), 1 U *AmpliTaq* DNA polymerase (Perkin Elmer Applied Biosystems, Weiterstadt, Germany), 0.5 µM of each primer, 100 µM of each deoxynucleoside triphosphate (Amersham Life Science, Braunschweig, Germany), and 5 ng template DNA were added to a total reaction volume of 50 µl at 4°C. Alternatively, where indicated (Table 1), a Master-Amp 2× PCR premix containing 100 mM Tris–HCl (pH 8.3), 100 mM KCl, 5 mM MgCl₂ (premix E) or 7 mM

and phylogenetically placed with the ARB software package [28]. The partial 16S rDNA sequences were added to a validated and optimized tree of about 5000 complete 16S rDNA sequences, while keeping the overall topology constant using the maximum parsimony method [29]. Phylogenetic trees of the amino acid-based gene sequences and the 16S rDNA sequences were constructed using distance

matrix and maximum parsimony methods supplied by the ARB software package (<http://www.biol.chemie.tu-muenchen.de/pub/ARB/>). On the nucleic acid level, evolutionary distances between pairs of sequences were calculated by using the Jukes–Cantor and Felsenstein equations [30,31] implemented in the ARB package. We deliberately refrained from showing bootstrap values in the trees, since

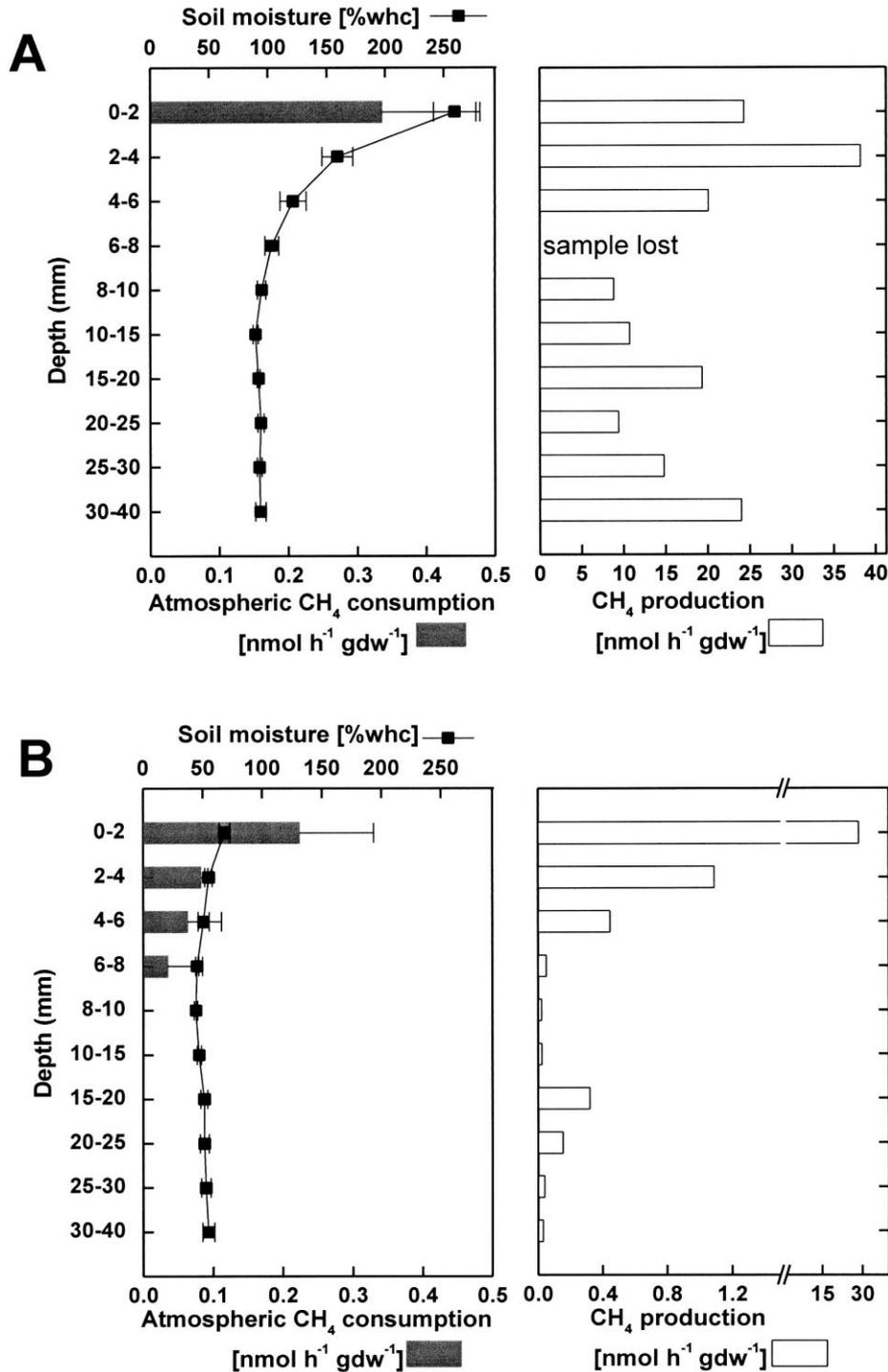


Fig. 1. Vertical profiles of atmospheric CH₄ consumption activity, soil moisture and potential CH₄ production in rice field soil cores, 1 day (A) and 8 days (B) after drainage; means \pm S.D. of $n=3$.

these values not only vary depending on the sequences included in the calculation, but also between software and the implemented algorithms used. Phylogenetic trees are mathematical estimates and not ‘true’ values and should be considered and referred to as such. Thus, bootstrap values give no additional information other than visualized by the tree itself.

2.8. Accession numbers

Sequences of partial *pmoA* and *mxoF* gene fragments and of 16S rRNA gene fragments of excised DGGE bands have been deposited in GenBank under the following accession numbers: AF277739–AF277744 (MB9 α -RC1, 2, 3, 5, 6, 7); AF277731–AF277736 (MB10 γ -RC1, 3, 5, 6, 7, 8); AF277728–AF277730 (*pmoA*-RC1, 2, 4); AF277737–AF277738 (*mxoF*-RC1, 2).

3. Results

3.1. CH₄ oxidation and production

One day after drainage the soil was still saturated with water. The soil water content exceeded 250% whc in the top 2-mm surface layer decreasing to 90% whc at 20 mm depth (Fig. 1A). The retention of water in the top soil layers was probably caused by the thin algal mat which had developed on the surface of the microcosms. Thus the vertical moisture profile resembled that of a rain-wetted soil. Ambient CH₄ was oxidized only in the top 2-mm soil layer (Fig. 1A). However, CH₄ production occurred throughout the soil core when incubated under anoxic conditions. After drainage for 8 days, the water content had dropped to 68% whc at the surface and 54% whc at 20 mm soil depth, and atmospheric CH₄ was consumed between 0 and 8 mm depth (Fig. 1B). The potential for CH₄ production under anoxic conditions had decreased dramatically, but was still detectable throughout the soil core (Fig. 1B).

3.2. PCR amplification

DNA was extracted from 2-mm depth intervals collected from the drained soil cores 1 and 8 days after drainage, and used in PCR amplification. PCR products of the expected sizes were obtained by amplification with the functional primer sets *pmoA* and *mxoF*, and the 16S rDNA primer sets MB9 α and MB10 γ . PCR of DNA extracted from soil is often subjected to biases caused by humic acids and other PCR-inhibiting substances. The primer sets MB9 α and *pmoA* produced PCR products with similar yields from all samples, indicating that the template DNA was readily amplifiable and no obvious PCR bias was caused by different amounts of inhibiting substances contained in the template DNA of different soil

depths and times. Amplifications with the primer sets *mxoF* and MB10 γ resulted in high PCR product yields only when DNA retrieved after drainage for 8 days was used as template, whereas only low (MB10 γ) or no PCR product (*mxoF*) was obtained when DNA was extracted 1 day after drainage.

3.3. MB9 α rDNA community pattern

The DGGE analysis of PCR products amplified with the MB9 α primer set showed a qualitatively similar banding pattern irrespective of the soil depth and the time after drainage (Fig. 2). DGGE band MB9 α -RC5 was the most prominent band and appeared in all samples with similar intensity. The same was the case with bands MB9 α -RC6 and MB9 α -RC7 which, however, were not as intense as MB9 α -RC5. DGGE bands MB9 α -RC1, -RC2, and -RC3 were more distinct after 8 days than after 1 day of drainage. They were all found in the entire soil core (0–20 mm depth) except band RC3 which was not detected below 8 mm soil depth (Fig. 2).

Sequence analysis of cloned MB9 α bands showed that all bands grouped within the α -*Proteobacteria* (Fig. 2). DGGE bands MB9 α -RC5 and MB9 α -RC6 grouped within the type II methanotrophs close to *Methylosinus/Methylocystis*. The most dominant band MB9 α -RC5 was identical to sequences detected before in the rhizosphere of rice, in most probable number enrichments from the rice rhizosphere (RR114, RR113, ERR112) [19] and in soil incubated under different O₂ and CH₄ mixing ratios (MO2) [17] using soil collected from the same field; band MB9 α -RC6 was almost identical. Bands MB9 α -RC1, -RC2, -RC3 and -RC7, on the other hand, were related to *Caulobacter* spp., *Sphingomonas* spp., *Methylobacterium* spp. and *Rhodospseudomonas acidophila*, respectively (Fig. 2). MB9 α -RC2 was related to DGGE band MO1 retrieved earlier from soil of the same rice field (Fig. 2).

3.4. MB10 γ rDNA community pattern

The DGGE analysis of PCR products amplified with the MB10 γ primer was not clearly resolved 1 day after drainage and below 4 mm soil depth due to low PCR product yield (Fig. 3). DGGE band MB10 γ -RC8 was the most pronounced band, but only in the top 4-mm soil layer. After drainage for 8 days, however, PCR products were obtained at high yields, and the DGGE analysis showed a distinct banding pattern changing with soil depth (Fig. 3). The community structure was different in almost every 2-mm soil section. The highest number of DGGE bands was detected between 4 and 8 mm depth, i.e. the depths at which activity of atmospheric CH₄ oxidation was detected (Fig. 1). In the soil layers above 4 mm and below 8 mm depth, a smaller number of DGGE bands was detected indicating lower microbial populations. Bands MB10 γ -RC1 to MB10 γ -RC5 were missing or only

barely detectable in the top layer between 0 and 2 mm depth, but intensified below 4 mm and were most pronounced below 10 mm depth (Fig. 3). In contrast, band MB10 γ -RC8 was most pronounced and intense at the surface and slowly disappeared in deeper soil layers, being

absent below 10 mm depth, while band MB10 γ -RC7 was most intense between 6 and 15 mm depth (Fig. 3).

Sequence analysis revealed that all bands tested grouped within the γ -Proteobacteria (Fig. 3). Bands MB10 γ -RC1 and MB10 γ -RC3 (most pronounced below 2 mm depth)

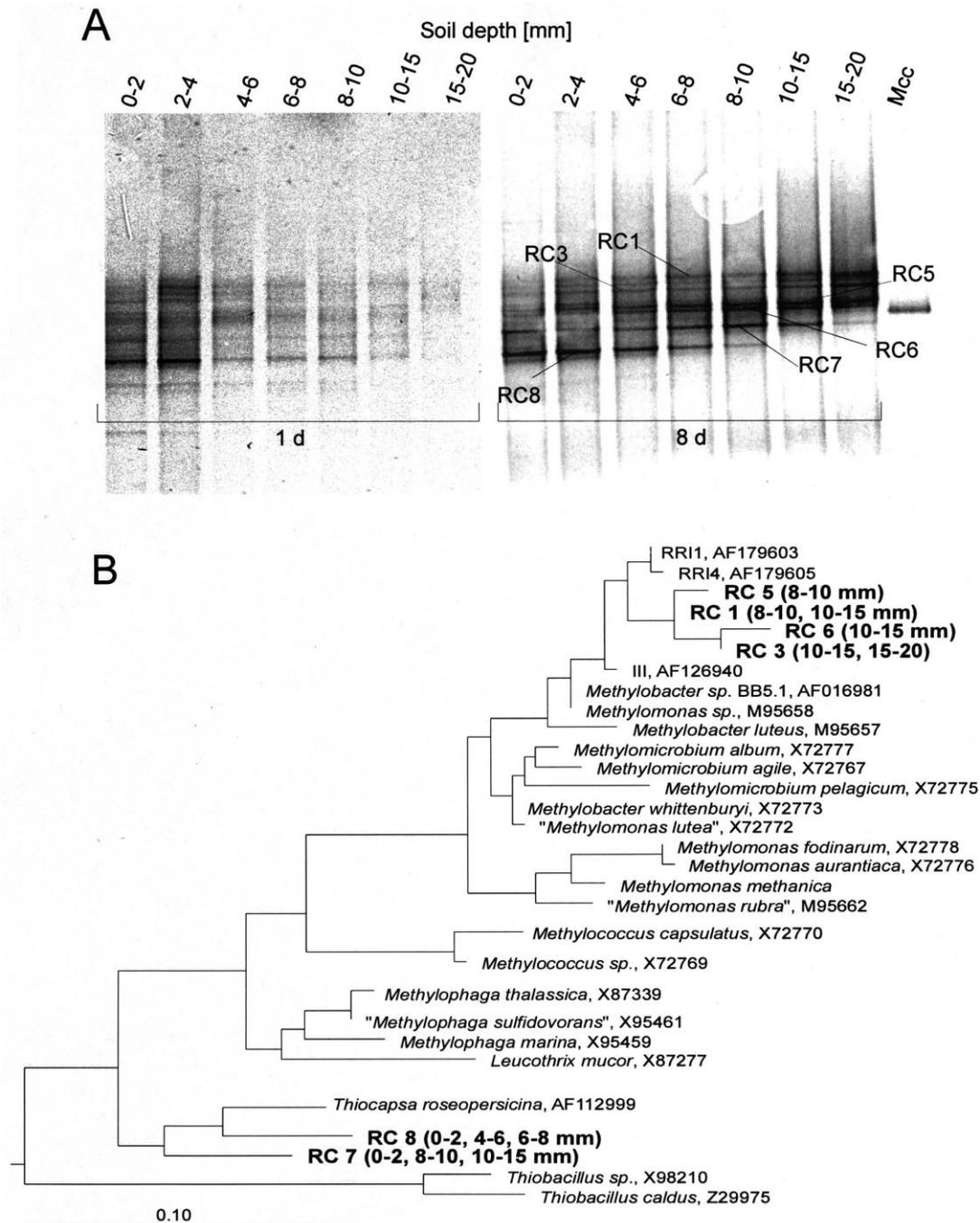


Fig. 3. DGGE banding pattern (A) obtained after amplification of DNA extracted from rice field soil cores using the 16S rDNA primer set MB10 γ targeting type I methylotrophs. Soil samples for DNA extraction were taken 1 and 8 days after drainage at indicated soil depths. Bands marked were sequenced; Mcc: *Methylococcus capsulatus*. The phylogenetic tree (B) was constructed with the partial 16S rDNA sequences (392 bp) and related sequences from γ -Proteobacteria. The partial sequences were added by maximum parsimony to a verified tree of complete 16S rDNA sequences without changing the tree topology. The scale bar represents estimated number of base changes per nucleotide sequence position; MB10 γ -RC1, -RC3, -RC5, -RC6, -RC7 and -RC8: marked DGGE bands; (mm): indicates from which lane on the DGGE gel the band was retrieved (corresponding to a particular soil depth); RRI1 and RRI4: clones retrieved from rice rhizosphere soil [19]; III: MB10 γ DGGE band sequence retrieved from rice field soil incubated with elevated CH₄ concentration [16].

but also bands MB10 γ -RC5 and MB10 γ -RC6 (below 6 mm depth) grouped among the type I methanotrophs, closest to previously described clones (RRI1, RRI14) from the rice rhizosphere [19], from rice field soil incubated under elevated CH₄ concentrations (MB10 γ band III) [16] and to *Methylobacter* spp. (Fig. 3). Bands MB10 γ -RC7 and MB10 γ -RC8, on the other hand, were most closely related to *Thiocapsa roseopersicina* or *Methylophaga* spp. (Fig. 3).

3.5. *mxoF* DGGE community pattern

The DGGE analysis of PCR products amplified with the functional primer set *mxoF* showed after drainage for 8 days one dominant band *mxoF*-RC2 which was present in all depth layers (Fig. 4). In the surface layers between 0 and 4 mm depth, a second faint band *mxoF*-RC1 was visible. Sequence analysis of the *mxoF* bands revealed that both *mxoF*-RC1 and *mxoF*-RC2 grouped among the type II methanotrophs, closest to the genus *Methylocystis* (Fig. 4). Band *mxoF*-RC2 was identical to the *mxoF* sequence 'mxoF band II' retrieved from rice field soil incubated under elevated CH₄ concentrations [16]. It was similar to 'mxoF band III', to *mxoF* sequence 'con2' retrieved from the rice rhizosphere (Henckel and Bodelier, unpublished data) and to two methanotrophic isolates from the rice rhizosphere (Frenzel et al., unpublished results), always using soil collected from the same field. Band *mxoF*-RC1 was identical to *mxoF* sequence 'con11' and to the *mxoF* DGGE band sequences MO4 and MO5 retrieved from the rice field soil incubated under different O₂ and CH₄ mixing ratios [17].

3.6. *pmoA* DGGE community pattern

The DGGE analysis of PCR products amplified with the functional primer set *pmoA* showed changes of the banding pattern with depth and time of drainage. One day after drainage, bands *pmoA*-RC1, -RC2 and -RC4 were detected in surface layers between 0 and 4 mm soil depth (Fig. 5). Below 4 mm soil depth, bands *pmoA*-RC2 and *pmoA*-RC4 were faint and were absent below 15 mm soil depth. After drainage for 8 days, band intensity of *pmoA*-RC4 had increased and this band was most pronounced down to 10 mm soil depth. Between 2 and 4 mm depth an additional band appeared, which was not detected in any other soil sample (Fig. 5). Band *pmoA*-RC1 was the most dominant band between 10 and 15 mm depth. Below 15 mm soil depth, no DGGE bands were detected.

Sequence analysis revealed that all bands tested (*pmoA*-RC1, -RC2, -RC4) grouped among the type I methanotrophs, closest to the genus *Methylococcus* (Fig. 5). Band *pmoA*-RC1 was similar to *pmoA* population 'pmoA band II' detected in rice field soil incubated under elevated CH₄ concentrations [16].

4. Discussion

Methane oxidation activity, measured as uptake of atmospheric CH₄, was confined to the top 2 mm layer of flooded rice field soil. Drainage of soil extended the vertical distribution of CH₄ oxidation down to 8 mm soil depth, albeit at decreasing activity. With decreasing soil water content, the methanotrophic community seemed to extend its zonation, presumably as O₂ became available to deeper soil layers. The CH₄ oxidation activities were in a similar range to those measured in wet meadow taiga and dry heath tundra soils from Alaska [32]. Nevertheless, the potential for consumption of atmospheric CH₄ was spatially restricted compared to the potential for CH₄ production. Methane production rates after drainage for 1 day were similar to those in flooded rice soil microcosms [14] and were still significant, albeit low, after drainage for 8 days. Therefore, it is not surprising that rice soil microcosms did not act as a sink for atmospheric CH₄ even after drainage [22]. However, drainage resulted in a dynamic change in the methanotrophic community within the soil profile, as revealed by molecular fingerprinting and sequencing of the 16S rRNA, *pmoA* and *mxoF* genes. It should be noted that the molecular data were obtained on a single unreplicated soil core which, however, was taken from the same soil microcosm in which one of the activity profiles was measured. Therefore, we trust that the temporal and vertical trends in activity and community structure can be compared to each other.

Type II methanotrophs were detected throughout the soil core directly after drainage as shown with the MB9 α primer set. The populations MB9 α -RC5 and MB9 α -RC6 were identical and very closely related to populations RRII3, RRII4, ERRII2 and c1 which had previously been detected in the rice rhizosphere of flooded rice microcosms, bulk soil and rice field soil incubated under 50 000 ppmv CH₄ [16,19]. The presence of the same type II methanotrophs in various studies indicates that these populations are dominant members of the type II methanotrophic community in Italian rice field soil and survive well periods of flooding and anoxic conditions. Methanotrophs seem to survive better under anoxic than oxic conditions, this characteristic being more pronounced in type II methanotrophs [33]. We conclude that type II methanotrophs represented by MB9 α -RC5 and MB9 α -RC6 are generally present in soil layers even when CH₄ oxidation is not active.

Other populations that were detected with the MB9 α primer set, e.g. MB9 α -RC1 and MB9 α -RC3, seemed to be confined to the upper soil layers. However, these populations were phylogenetically affiliated with non-methanotrophic methylotrophs, such as *Caulobacter* or *Methylobacterium* spp. and, thus, were probably not involved in CH₄ oxidation.

We have repeatedly found that the *mxoF* gene was not or just barely detectable in soil that was not actively oxi-

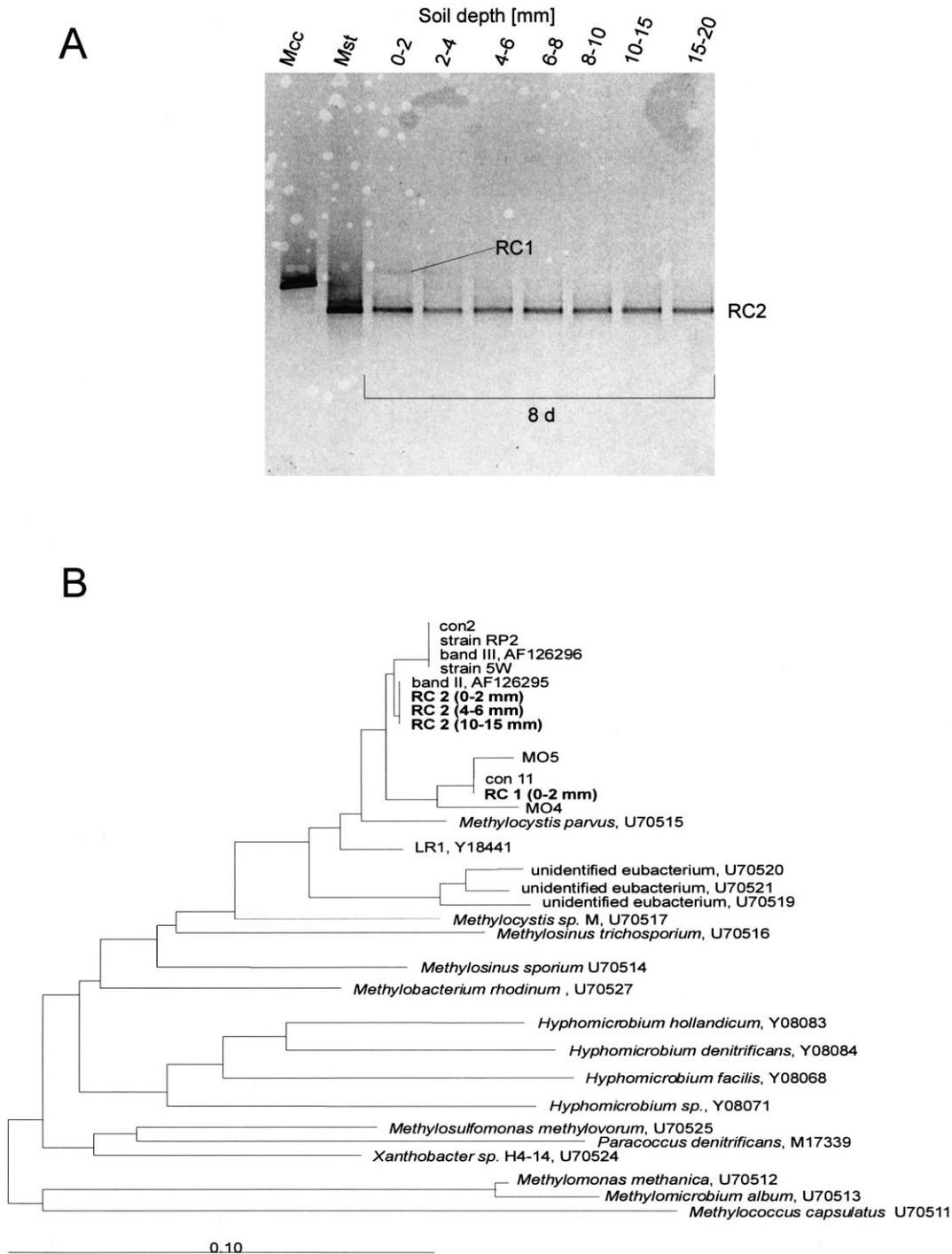


Fig. 4. DGGE banding pattern (A) obtained after amplification of DNA extracted from rice field soil cores using the functional primer set *mxhF* targeting the gene of the α -subunit of the MDH present in all methylophilic organisms. Soil samples for DNA extraction were taken 8 days after drainage at indicated soil depths. Bands marked were sequenced; Mcc: *M. capsulatus*; Mst: *Methylosinus trichosporium*. The phylogenetic tree (B) was based on the derived amino acid sequences of *mxhF* gene sequences retrieved from *mxhF* DGGE bands showing the relationship of the marked DGGE bands to other methylophilic organisms. The scale bar represents estimated number of changes per amino acid sequence position; *mxhF*-RC1, -RC2: marked DGGE bands; (mm): indicates from which lane on the DGGE gel the band was retrieved (corresponding to a particular soil depth); con2, con11: *mxhF* DGGE band sequences retrieved from rice rhizosphere soil (Henckel and Bodelier, unpublished data); band II, band III: *mxhF* DGGE band sequences retrieved from rice field soil incubated with elevated CH_4 concentration [16]; MO4, MO5: *mxhF* DGGE band sequences retrieved from rice field soil incubated under different O_2 and CH_4 mixing ratios [17]; LR1: high affinity type II methanotroph [36]; strains RP2, 5W: type II methanotrophs enriched from the rice rhizosphere (Frenzel et al., unpublished data).

dizing CH₄ ([16,17], Henckel and Bodelier, unpublished data). One day after drainage we found that the *mxoF* gene was only detectable in the top 2-mm soil layer. After drainage for 8 days, however, *mxoF*-RC2, distantly related

to *Methylocystis* spp., became detectable in all depths. This population grouped very close to type II methanotrophs which had been detected before in soil from the same field, i.e. band *mxoF* II [16]. However, it should be

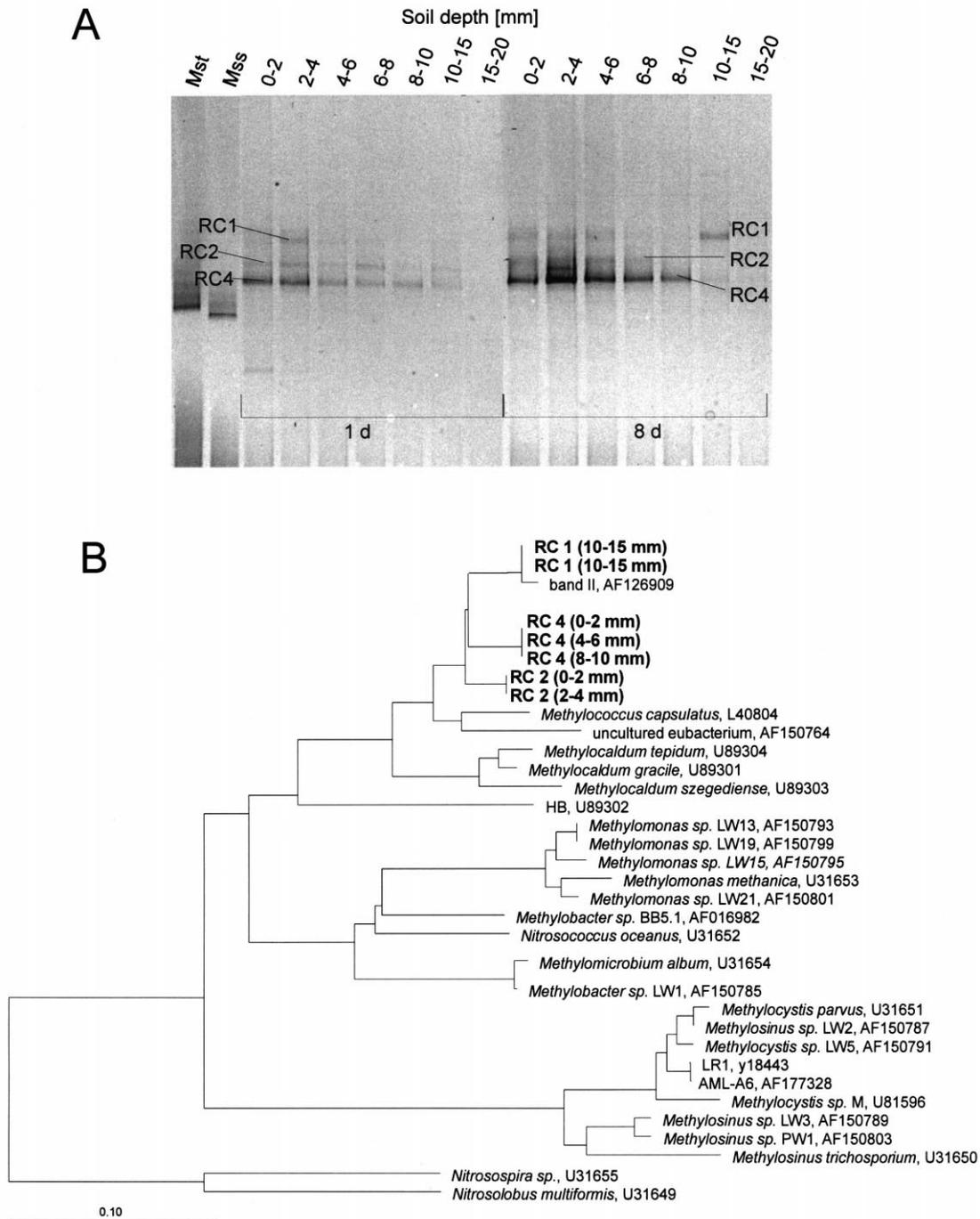


Fig. 5. DGGE banding pattern (A) obtained after amplification of DNA extracted from rice field soil cores using the functional primer set *pmoA* targeting the gene of the α -subunit of the pMMO present in all methanotrophs. Soil samples for DNA extraction were taken 1 and 8 days after drainage at indicated soil depths. Bands marked were sequenced; Mst: *M. trichosporium*; Mss: *M. sporium*. The phylogenetic tree (B) was based on the derived amino acid sequences of *pmoA* and *amoA* gene sequences retrieved from *pmoA* DGGE bands, showing the relationship of the marked DGGE bands to other methanotrophs and ammonium oxidizers. The scale bar represents estimated number of changes per amino acid sequence position; *pmoA*-RC1, -RC2, -RC4: marked DGGE bands; (mm): indicates from which lane on the DGGE gel the band was retrieved (corresponding to a particular soil depth); band II: *pmoA* DGGE band sequence retrieved from rice field soil incubated with elevated CH₄ concentration [16]; LR1: high affinity type II methanotroph [36]; AML-A6: type II methanotroph isolated from a landfill cover soil [41]; HB: thermophilic methanotroph [42].

noted that the *mxoF* gene is present in all methylotrophic species irrespective of whether they are able to oxidize CH₄. Therefore, we cannot be sure that the populations represented by *mxoF*-RC1 and *mxoF*-RC2 are able to oxidize CH₄.

The populations detected with the *pmoA* primer set have the gene for the pMMO subunit tested and thus should be able to oxidize CH₄. Indeed, *pmoA* was mainly detected in the upper soil layers. After 8 days of drainage, *pmoA*-RC2 and *pmoA*-RC4 were not detectable below 8–10 mm depth, which corresponds to the soil depth down to which oxidation of atmospheric CH₄ was detectable. Similarly after drainage for 1 day, the *pmoA* DGGE bands were most pronounced in the top 4-mm soil layers and oxidation of atmospheric CH₄ was detectable down to 2 mm depth. However, it should be noted that CH₄ oxidation activity, albeit at elevated CH₄ concentrations, may also have occurred in soil layers that were unable to oxidize CH₄ at atmospheric concentrations. This possibility may explain why faint *pmoA* DGGE bands were also detectable in soil layers that were unable to oxidize atmospheric CH₄. The sequenced bands *pmoA*-RC1, *pmoA*-RC2 and *pmoA*-RC4 were related to the genus *Methylococcus*, a type I methanotroph (also called type X [34]) containing both the particulate (pMMO) and the soluble methane monooxygenase. *Methylococcus* contains multiple *pmoA* gene copies; hence the number of *pmoA* bands does not necessarily correlate to the number of populations [16,35].

Interestingly, we detected in this study only the *pmoA* of type I methanotrophs. Consistent with the dominance of type I methanotrophic *pmoA* populations, drainage also stimulated the type I methanotrophic community that was represented by the 16S rDNA amplified by the MB10γ primer set. One day after drainage, distinct type I methanotrophs were not detectable below 4 mm soil depth and were only barely detectable in the top soil layers. However, after drainage for 8 days the type I methanotrophic community structure revealed distinct DGGE patterns with different type I populations dominating in different soil layers. During drainage, an opposite gradient of CH₄ and O₂ concentrations should exist in the soil core and the type I populations probably responded by growing at the respective optimum. Interestingly, the diversity of type I *pmoA* populations was not so pronounced in the top 2-mm soil layer, in which atmospheric CH₄ oxidation activity was highest, but instead diversity was most pronounced in deeper soil. Again, however, some of the MB10γ populations were also found in soil layers below the depth at which atmospheric CH₄ was oxidized. The detected and sequenced MB10γ populations were closest related to *Methylobacter* spp. This is in contrast to the *pmoA* populations which were closest related to *Methylococcus* spp.

Beside this discrepancy, we noted a number of other discrepancies compared to earlier studies using soil from

the same rice field. One is that we detected in this study only the *pmoA* of type I methanotrophs, although both type I and II methanotrophs have been detected before with the same *pmoA* primer set [16,17,36]. Another discrepancy was that only the *mxoF* genes of type II methanotrophs were detected, although *mxoF* of type I methanotrophs had been detected before ([16,36], Henckel and Bodelier, unpublished). We have no explanation for these discrepancies. The seemingly conflicting results of the different molecular fingerprints in this study demonstrate that a single molecular data set would not show the complete community structure but only open a narrow view of the system. Thus an additional molecular assay, whether molecular fingerprint or clone sequence, provides additional information from a different perspective.

Recently, we have shown that type I methanotrophs were able to proliferate rapidly and dominate CH₄ oxidation in aerated rice field soil when CH₄ was supplied at low (1000 ppmv) mixing ratios, whereas type II methanotrophs only proliferated at high (10 000 ppmv) CH₄ mixing ratios [17]. However, type II methanotrophs were the dominant community in flooded rice soil [19]. It has been suggested that type I methanotrophs dominate in environments that allow rapid growth of methane-oxidizing bacteria, while type II methanotrophs are more abundant in environments where growth rates are periodically restricted [34,37]. Our results are consistent with this hypothesis. The community shifts following drainage were less pronounced with type II than with type I methanotrophs, indicating that type II methanotrophs had a better ability to survive but did not react rapidly to environmental conditions. Flooded rice field soil is characterized by relatively homogeneous soil conditions that are mostly adverse to CH₄ oxidation. However, high CH₄ production rates in deep soil supply high CH₄ concentrations at the soil surface layer where O₂ is also available and thus provide the optimum conditions for the proliferation of type II methanotrophs. After drainage, however, soil conditions become increasingly heterogeneous, CH₄ mixing ratios decrease and, thus, type I methanotrophs are favored. The simultaneous increase of populations with type II *mxoF* genes may be due to methylotrophs growing on substrates other than CH₄.

In summary, our results suggest that drainage of rice fields affects the methanotrophic community structure, stimulating the development of type I methanotrophs. Methanotrophic populations able to oxidize low atmospheric CH₄ concentrations become active with increasing depth upon drainage. We never detected any of the novel methanotrophic groups that are believed to be responsible for uptake of atmospheric CH₄ in forest soils [38,39]. However, it remains unclear which of the populations detected by molecular techniques were responsible for this activity in rice field soil. More generally, future research should assess the extent of gene expression among the methanotrophic populations and not only their presence.

Acknowledgements

We thank Bianca Wagner for excellent assistance with cloning and sequencing, Horst Henseling for construction of the microcosms and Sylvia Schnell for discussion. The work was financially supported by the European Commission (BIO-4-CT-960419).

References

- [1] Conrad, R. (1997) In: Production and Consumption of Methane in the Terrestrial Biosphere (Helas, G., Slanina, J. and Steinbrecher, R., Eds.), pp. 27–44. SBP Academic Publ., Amsterdam.
- [2] Neue, H.U. (1997) Fluxes of methane from rice fields and potential for mitigation. *Soil Use Manage.* 13, 258–267.
- [3] Sass, R.L., Fisher, F.M., Wang, Y.B., Turner, F.T. and Jund, M.F. (1992) Methane emission from rice fields, the effect of floodwater management. *Glob. Biogeochem. Cycles* 6, 249–262.
- [4] Yagi, K., Tsuruta, H., Kanda, K. and Minami, K. (1996) Effect of water management on methane emission from a Japanese rice paddy field, Automated methane monitoring. *Glob. Biogeochem. Cycles* 10, 255–267.
- [5] Jäckel, U. and Schnell, S. (2000) In: Role of Microbial Iron Reduction in Paddy Soil (VaHam, J., Baede, A.P.M., Meyer, L.A. and Ybema, R., Eds.), pp. 143–144. Kluwer, Dordrecht.
- [6] Ratering, S. and Conrad, R. (1998) Effects of short-term drainage and aeration on the production of methane in submerged rice soil. *Glob. Change Biol.* 4, 397–407.
- [7] Sigren, L.K., Lewis, S.T., Fisher, F.M. and Sass, R.L. (1997) Effects of field drainage on soil parameters related to methane production and emission from rice paddies. *Glob. Biogeochem. Cycles* 11, 151–162.
- [8] Achtnich, C., Bak, F. and Conrad, R. (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.
- [9] Conrad, R. and Rothfuss, F. (1991) Methane oxidation in the soil surface layer of a flooded rice field and the effect of ammonium. *Biol. Fertil. Soils* 12 (1), 28–32.
- [10] Frenzel, P., Rothfuss, F. and Conrad, R. (1992) Oxygen profiles and methane turnover in a flooded rice microcosm. *Biol. Fertil. Soils* 14, 84–89.
- [11] Gilbert, B. and Frenzel, P. (1998) Rice roots and CH₄ oxidation – the activity of bacteria, their distribution and the microenvironment. *Soil Biol. Biochem.* 30, 1903–1916.
- [12] van der Gon, D.H.A.C. and Neue, H.U. (1996) Oxidation of methane in the rhizosphere of rice plants. *Biol. Fertil. Soils* 22, 359–366.
- [13] Bosse, U. and Frenzel, P. (1997) Activity and distribution of methane-oxidizing bacteria in flooded rice soil microcosms and in rice plants (*Oryza sativa*). *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 1199–1207.
- [14] Bosse, U. and Frenzel, P. (1998) Methane emissions from rice microcosms – the balance of production, accumulation and oxidation. *Biogeochemistry* 41, 199–214.
- [15] Henckel, T. and Conrad, R. (1998) Characterization of microbial NO production, N₂O production and CH₄ oxidation initiated by aeration of anoxic rice field soil. *Biogeochemistry* 40, 17–36.
- [16] Henckel, T., Friedrich, M. and Conrad, R. (1999) Molecular analyses of the methane-oxidizing microbial community in rice field soil by targeting the genes of the 16S rRNA, particulate methane monooxygenase, and methanol dehydrogenase. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 1980–1990.
- [17] Henckel, T., Roslev, P. and Conrad, R., Effects of oxygen and methane on presence and activity of the indigenous methanotrophic community in rice field soil. *Environ. Microbiol.* (in press).
- [18] Schimel, J.P., Holland, E.A. and Valentine, D. (1993) In: Controls on Methane Flux from Terrestrial Ecosystems (Harper, L.A. et al., Eds.), pp. 167–182. American Society of Agronomy, Madison, WI.
- [19] Bodelier, P.L.E., Roslev, P., Henckel, T. and Frenzel, P. (2000) Ammonium stimulates methane oxidation in rice soil. *Nature* 403, 421–424.
- [20] Bender, M. and Conrad, R. (1992) Kinetics of CH₄ oxidation in oxic soils exposed to ambient air or high CH₄ mixing ratios. *FEMS Microbiol. Ecol.* 101 (4), 261–270.
- [21] Thurlow, M., Kanda, K., Tsuruta, H. and Minami, K. (1995) Methane uptake by unflooded paddy soils – The influence of soil temperature and atmospheric methane concentration. *Soil Sci. Plant Nutr.* 41, 371–375.
- [22] Jäckel, U., Schnell, S. and Conrad, R., Effect of moisture, texture and aggregate size of paddy soil on production and consumption of CH₄. *Soil Biol. Biochem.* (submitted).
- [23] More, M.I., Herrick, J.B., Silva, M.C., Ghiorse, W.C. and Madsen, E.L. (1994) Quantitative cell lysis of indigenous microorganisms and rapid extraction of microbial DNA from sediment. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 1572–1580.
- [24] Tsieng, H.C., Bratine, B.J., Tsuji, K. and Hanson, R.S. (1990) Use of oligodeoxynucleotide signature probes for identification of physiological groups of methylotrophic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 2858–2865.
- [25] McDonald, I.R. and Murrell, J.C. (1997) The methanol dehydrogenase structural gene *mxoA* and its use as a functional gene probe for methanotrophs and methylotrophs. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 3218–3224.
- [26] McDonald, I.R. and Murrell, J.C. (1997) The particulate methane monooxygenase gene *pmoA* and its use as a functional gene probe for methanotrophs. *FEMS Microbiol. Lett.* 156, 205–210.
- [27] Rotthauwe, J.H., Witzel, K.P. and Liesack, W. (1997) The ammonia monooxygenase structural gene *amoA* as a functional marker – molecular fine-scale analysis of natural ammonia-oxidizing populations. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 4704–4712.
- [28] Strunk, O. and Ludwig, W. (1996) ARB: a Software Environment for Sequence Data. Technische Universität München, Munich.
- [29] Ludwig, W., Strunk, O., Klugbauer, S., Klugbauer, N., Weizenegger, M., Neumaier, J., Bachleitner, M. and Schleifer, K.H. (1998) Bacterial phylogeny based on comparative sequence analysis. *Electrophoresis* 19, 554–568.
- [30] Jukes, T.H. and Cantor, C.R. (1969) In: Evolution of Protein Molecules, Vol. 3 (Munro, H.N., Ed.), pp. 21–132. Academic Press, New York.
- [31] Felsenstein, J. (1993) PHYLIP: phylogeny inference package. University of Washington, Seattle, WA.
- [32] Gullledge, J. and Schimel, J.P. (1998) Moisture control over atmospheric CH₄ consumption and CO₂ production in diverse Alaskan soils. *Soil Biol. Biochem.* 30, 1127–1132.
- [33] Roslev, P. and King, G.M. (1994) Survival and recovery of methanotrophic bacteria starved under oxic and anoxic conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 2602–2608.
- [34] Hanson, R.S. and Hanson, T.E. (1996) Methanotrophic bacteria. *Microbiol. Rev.* 60, 439.
- [35] Semrau, J.D., Chistoserdov, A., Lebron, J., Costello, A., Davagnino, J., Kenna, E., Holmes, A.J., Finch, R., Murrell, J.C. and Lidstrom, M.E. (1995) Particulate methane monooxygenase genes in methanotrophs. *J. Bacteriol.* 177, 3071–3079.
- [36] Dunfield, P.F., Liesack, W., Henckel, T., Knowles, R. and Conrad, R. (1999) High-affinity methane oxidation by a soil enrichment culture containing a type II methanotroph. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 1009–1014.
- [37] Vecherskaya, M.S., Galchenko, V.F., Sokolova, E.N. and Samarkin, V.A. (1993) Activity and species composition of aerobic methanotrophic communities in tundra soils. *Curr. Microbiol.* 27, 181–184.
- [38] Holmes, A.J., Roslev, P., McDonald, I.R., Iversen, N., Henriksen, K. and Murrell, J.C. (1999) Characterization of methanotrophic bacte-

- rial populations in soils showing atmospheric methane uptake. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 3312–3318.
- [39] Henckel, T., Jäckel, U., Schnell, S. and Conrad, R. (2000) Molecular analyses of novel methanotrophic communities in forest soil that oxidize atmospheric methane. *Appl. Environ. Biol.* 66, 1801–1808.
- [40] Dedysh, S.N., Panikov, N.S., Liesack, W., Grosskopf, R., Zhou, J.Z. and Tiedje, J.M. (1998) Isolation of acidophilic methane-oxidizing bacteria from northern peat wetlands. *Science* 282, 281–284.
- [41] Wise, M.G., McArthur, J.V. and Shimkets, L.J. (1999) Methanotroph diversity in landfill soil: isolation of novel type I and type II methanotrophs whose presence was suggested by culture-independent 16S rDNA analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 4887–4897.
- [42] Bodrossy, L., Kovacs, K.L., McDonald, I.R. and Murrell, J.C. (1999) A novel, thermophilic methane-oxidising γ -Proteobacterium. *FEMS Microbiol. Lett.* 170, 335–341.

Dank

Mein Dank gilt Prof. Dr. Ralf Conrad für die Überlassung des Themas, für die Betreuung meiner Arbeit, die gewährten Freiräume und für die hilfreichen und kritischen Diskussionen.

Besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Sylvia Schnell für ihre Betreuung, ihr großes Interesse an meiner Arbeit und die hilfreichen Diskussionen und Anregungen.

Herrn Prof. Dr. W. Buckel danke ich für die Erstellung des Zweitgutachtens.

Allen Mitarbeitern und ehemaligen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe und Abteilung, besonders Inko Arth, Conni Bannert, Markus Drescher, Peter Dunfield, Axel Fey, Peter Frenzel, Thilo Henckel, Horst Henseling, Jürgen Heyer, Melanie Klose, Martin Krüger, Bernhard Nüßlein, Qu Dong, Nicole Treude, Stefan Ratering und Nina Ringleff möchte ich für die sehr gute Atmosphäre und Zusammenarbeit Danken.

Insbesondere danke ich: Peter Frenzel und Martin Krüger für ihre Hilfe bei logistischen und praktischen Fragestellungen während der Feldexperimente, Peter Dunfield für seine Hilfe bei den statistischen Fragestellungen, Thilo Henckel für die erfolgreiche Zusammenarbeit, Horst Henseling für den Bau der verschiedenen Flußkammern, die meine Arbeit sehr erleichtert hat, Markus Drescher für seine Hilfe bei alltäglichen Computerproblemen und besonders Jürgen Heyer, Stefan Ratering und Nicole Treude für ihre unermüdliche Diskussionsbereitschaft.

Herrn Dr. Salvatore Russo und allen Mitarbeitern des Istituto Sperimentale per la Cerealicoltura, in Vercelli, danke ich für ihre Unterstützung bei den Feldexperimenten.

Schließlich möchte ich meiner Familie Danken, die mich bei all meinen Aktivitäten zur Arbeit unterstützt hat, besonderer Dank gilt Hildegard.