

Einfluss der Temperatur auf die Methanbildung in anoxischen Standorten

Dissertation
Zur
Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. Nat.)

dem
Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Bernhard Nüßlein

aus Würzburg

Marburg/Lahn 2000

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden von Juni 1997 bis Mai 2000 am Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie, Abteilung Biogeochemie, in Marburg/Lahn unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Ralf Conrad durchgeführt.

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

Erstgutachter: Prof. Dr. Ralf Conrad

Zweitgutachter: Prof. Dr. Rudolf K. Thauer

Tag der mündlichen Prüfung: 23.6.2000

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	1
ZUSAMMENFASSUNG	2
1. EINLEITUNG	4
Der anaerobe Abbau von Biomasse unter aquatischen Bedingungen.....	4
Ziele der Arbeit	8
2. MATERIAL UND METHODEN.....	9
2.1 Untersuchungsgebiete	9
2.1.1 Plußsee.....	9
2.1.2 Lake Kinneret.....	9
2.2 Probenentnahme	11
2.2.1 Probenentnahme von Profundalsediment aus dem Plußsee	11
2.2.2 Probenentnahme von Sediment aus dem Lake Kinneret.....	11
2.3 Verarbeitung des Sediments.....	11
2.4 Analytische Methoden	12
2.4.1 Gaschromatische Analysen.....	12
2.4.2 Analyse organischer und anorganischer Verbindungen.....	14
2.5. Messung radioaktiver Isotope.....	15
2.5.1 Szintillationsmessungen.....	15
2.5.2 Analyse von ¹⁴ C-Gasen mit einem Radioaktivitäts-Gas-Detektor (RAGA)	16
2.5.3 Analyse von radioaktiven Säuren.....	16
2.6 Analyse der stabilen Isotopensignatur von CH ₄ , CO ₂ , organischer Säuren und Alkohole.....	17
2.7 Verwendete Chemikalien und Gase.....	18
2.8 Durchgeführte Versuche.....	18
2.8.1 Bestimmung der Methanproduktionsraten.....	19
2.8.2 Hemmung der Methanogenese mit verschiedenen Hemmstoffen.....	19
2.8.3 Zugabe von organischen Substanzen	20
2.8.4 Zugabe von Wasserstoff.....	20
2.8.5 Zugabe von Glukose und Pectin	21
2.8.6 Versuche mit radioaktiv markierten Substraten.....	21
2.9 Berechnungen.....	23
2.9.1 Ratenberechnungen	23
2.9.2 Partialdruck von Wasserstoff	23
2.9.3 Berechnung des vertikalen diffusiven Flusses und der Verweilzeit von Methan im Plußsee.....	24
2.9.4 Berechnungen für die radioaktiven Versuche.....	24
2.9.5 Berechnungen der Isotopensignatur von CH ₄ und CO ₂	26

2.9.6 Thermodynamische Berechnungen	26
3. ERGEBNISSE.....	29
3.1 Methanproduktion im eutrophen Plußsee: jahreszeitliche Änderungen, Einfluss der Temperatur und Stoffwechselprozesse im Profundal Sediment.....	29
3.2 Lake Kinneret: Untersuchungen zur Methanbildung.....	34
3.2.1 Methanproduktion im Lake Kinneret: Temperaturabhängigkeit und Lokalisation der Methanbildung, Charakterisierung der chemischen Parameter.....	34
3.2.2 Hemmung der Methanbildung im Profundalsediment vom Lake Kinneret.....	44
3.2.3 Bestimmung des Acetatumsatzes im Sediment von Lake Kinneret.....	52
3.2.4 Bestimmung des Anteils der Methanbildung aus H ₂ /CO ₂ im Sediment von Lake Kinneret.....	60
3.2.5 Untersuchungen zur Isotopensignatur von CH ₄ und CO ₂ im Lake Kinneret.....	64
3.2.6 Stimulierung der Methanogenese im Plußsee und Lake Kinneret mit verschiedenen Substraten: Einfluss der Substrate auf die Isotopensignatur der gebildeten Gase.....	69
4 DISKUSSION	81
4.1 Methanproduktion im Plußsee: Jahreszeitlicher Verlauf, Methanzzyklus und Prozesse, die die Methanproduktion beeinflussen	81
4.2 Methanproduktion im Lake Kinneret	84
4.2.1 Einfluss der Temperatur auf die Methanbildung	84
4.2.2 Hemmung der Methanogenen	86
4.2.3 Umsatz von radioaktiv markierten Substraten.....	89
4.2.4 Bestimmung der Isotopensignatur von CH ₄ und CO ₂	95
4.3 Einfluss von verschiedenen Substraten auf die Isotopensignatur des gebildeten Methans im Plußsee und Lake Kinneret.....	98
4.3.1 Plußsee.....	98
4.3.2 Lake Kinneret.....	99
Ausblick:.....	103
5. LITERATURVERZEICHNIS	104
ANHANG	116
DANKSAGUNG	154
ERKLÄRUNG	155

Abkürzungsverzeichnis

BES	Brom-ethan-sulfonsäure
CH ₃ F	Methylfluorid
dpm	decays per minute
Ci	Curie
FID	Flammenionisationsdetektor
GC	Gaschromatograph
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie
ppmv	parts per million by volume
RI	respiratorischer Index
RPM	Rotations Per Minute
v/v	Volumen pro Volumen (volume per volume)
w/v	Gewicht pro Volumen (weight per volume)

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Methanproduktion in Sedimenten aus zwei Süßwasserseen, dem gemäßigten eutrophen Plußsee (Schleswig-Holstein) und dem subtropischen mesooligotrophen Lake Kinneret (Israel), untersucht. Das Hauptziel hierbei war festzustellen, welchen Einfluss die Temperatur auf die mikrobiellen Stoffwechselwege hat, die in den anaeroben Abbau von organischem Material bis zum Endprodukt Methan involviert sind. Bei beiden untersuchten Seesedimenten wurde gezeigt, dass eine Erhöhung der Inkubationstemperatur über die *in situ* Temperatur zu einem Anstieg der Methanproduktion führte, was bedeutet, dass die optimale Temperatur für den anaeroben Abbau über der *in situ* Temperatur lag.

Im Plußsee wurde bei der *in situ* Temperatur von 4°C das Methan überwiegend durch acetoklastische Methanogenese gebildet. Thermodynamisch wären aber auch Wasserstoff und Methanol als Substrate in Frage gekommen. Durch Experimente mit radioaktiv markierten Bicarbonat konnte aber gezeigt werden, dass nur bei einer Inkubationstemperatur von 25°C Methan aus H_2/CO_2 gebildet wurde. $[2-^{14}C]$ Acetat wurde dagegen sowohl bei 25°C als auch bei 4°C zu $^{14}CH_4$ (80 %) und $^{14}CO_2$ (20 %) umgesetzt. Der Abbauweg von organischem Material zu Methan läuft bei beiden Inkubationstemperaturen hauptsächlich über Acetat. Dies konnte durch die Hemmung der Methanogenese mit spezifischen Hemmstoffen für die Methanogenen und die Zugabe von Substraten (Glukose und Pectin) und deren dokumentierter Abbau zu Methan gezeigt werden. Die acetoklastische Methanogenese findet höchstwahrscheinlich in Mikronischen statt, in denen die fermentierenden Bakterien und die Methanogenen in direkter Nachbarschaft zueinander stehen, da es zu keiner vollständigen Equilibrierung zwischen dem zugegebenen $[2-^{14}C]$ Acetat und dem Sediment kam. Wasserstoff war limitierend für die hydrogenotrophe Methanogenese, was durch die sofortige Stimulation der Methanbildung nach Wasserstoffzugabe gezeigt werden konnte. Durch die Bestimmung der stabilen Isotopensignatur von CH_4 und CO_2 konnten die in den zuvor genannten Experimenten erhaltenen Ergebnisse bestätigt werden.

Das Profundalsediment des Lake Kinneret wies im Gegensatz zum Profundalsediment des Plußsees eine deutliche Schichtung auf. Die höchsten Methanbildungsraten wurden in den oberen 2 cm gemessen. Darunter nahm das Methanbildungspotential ab. Durch die Bestimmung des Turnover von $[2-^{14}C]$ Acetat konnte gezeigt werden, dass die methanogene Acetatumsetzung 100 % der Gesamtmethanbildung erklären konnte. Der Anteil der hydrogenotrophen Methanogenese an der gesamten Methanproduktion machte

aber noch einmal bei 15°C zwischen 25 - 30 % und bei 30°C 45 % aus. Letzterer war somit höher als der theoretisch mögliche Anteil von maximal 33 %. Mit steigender Temperatur nahm somit der Anteil der hydrogenotrophen Methanogenese an der Gesamtmethanbildung zu. Die bei der Bestimmung des [2-¹⁴C]Acetatumsatzes ermittelten hohen respiratorischen Indizes (RI-Werte) zeigten, dass das Acetat nicht nur methanogen, sondern auch oxidativ umgesetzt wurde. Potentielle Elektronenakzeptoren wie Sulfat, Nitrat und Eisen(III) waren aber alle reduziert. So blieb nur die syntrophe Acetatoxidation, auch aufgrund der thermodynamischen Daten, der einzige vorstellbare Abbauweg. Hierbei wird Acetat zunächst zu H₂ plus CO₂ umgesetzt, welcher dann durch hydrogenotrophe Methanogene weiter zu CH₄ umgesetzt wird. Diese Annahme ist im Einklang mit dem Befund, dass acetoklastische und hydrogenotrophe Methanogenese zusammen über 100 % der Gesamtmethanbildung ausmachen. Die Bestimmung der stabilen Isotopensignatur von CH₄ und CO₂ ist ebenfalls im Einklang mit einem syntrophen Acetatabbau. Die Stimulierung der Methanbildung durch die zugegebenen Substrate Acetat, Methanol und Wasserstoff und deren Einfluss auf die Isotopensignatur von CH₄ und CO₂ konnte durch die Bestimmung der CH₄- und CO₂-Konzentrationen und der δ¹³CH₄- und δ¹³CO₂-Werte sowohl quantitativ als auch qualitativ dokumentiert werden.

1. Einleitung

Der anaerobe Abbau von Biomasse unter aquatischen Bedingungen

Biomasse wird in Sedimenten von Süßwasserseen unter oxischen Bedingungen unter anderem von Bakterien komplett zu CO_2 und H_2O abgebaut (Sweerts et al 1991). Unter anoxischen Bedingungen entstehen aus der Biomasse nach dem Durchlaufen mehrerer Zwischenstufen als Endprodukte CH_4 und CO_2 (Rudd und Hamilton 1978, Rudd und Taylor 1980). Der Abbau beginnt mit der Hydrolyse der Biopolymeren zu Monomeren wie einfache Zucker und Fermentation zu Alkoholen und Fettsäuren (Abbildung 1). Ein wichtiges Polymer, welches in Seesedimenten vorkommt, ist Pectin. Es ist ein Polymer, das aus vernetzten β -Galacturonsäure-Monomeren besteht; es kann anaerob gespalten werden und zu Acetat, Methanol und Butyrat vergoren werden (Schink und Zeikus 1982). Nach der Vergärung zu Butyrat wird dieses von syntrophen Bakterien zu Acetat, H_2 und CO_2 umgesetzt. Acetat und H_2/CO_2 können nun direkt von Methanogenen zu CH_4 umgesetzt werden (Zehnder 1978, Zehnder und Brock 1979). Wird ausschließlich Acetat von den Methanogenen als Substrat verwendet, spricht man von acetoklastischer Methanogenese. Im Falle von H_2/CO_2 als Substrate handelt es sich um hydrogenotrophe Methanogenese. Wasserstoff kann außer von Methanogenen in Süßwasserseesedimenten noch von homoacetogenen Bakterien mit Kohlendioxyd zu Acetat umgesetzt werden (Conrad et al. 1987, Conrad et al. 1989, Kotsyurbenko et al. 1993). Außer den genannten Substraten können von den Methanogenen noch Formiat, Methanol, Ethanol und Methylamine als Substrate unter limnischen Bedingungen verwendet werden (Garcia 1990, Schönheit 1993). Hierbei unterscheidet man dann, ob diese Substrate mittels Reduktion der Methylgruppe oder nach Umsetzung zu H_2 und CO_2 durch die Reduktion von CO_2 verwertet werden. In Süßwasserseen wurde von diesen Substraten vor allem Methanol als ein weiteres wichtiges Substrat angenommen (Naguib 1982, 1988).

Außer der Methanbildung können bei Vorhandensein der entsprechenden Elektronenakzeptoren noch andere respiratorische Prozesse in Seesedimenten bei dem Abbau von Biomasse eine Rolle spielen. Diese Prozesse laufen hierbei in einer bestimmten Reihenfolge ab. Zuerst erfolgt die Nitratreduktion, gefolgt von der Manganreduktion, Eisenreduktion und Sulfatreduktion. Diese Reihenfolge wurde durch die Thermodynamik der einzelnen Prozesse erklärt (thermodynamische Theorie; Ponnamperna 1972, Zehnder und Stumm 1988).

In Süßwassersedimenten tritt vor allem die Sulfatreduktion in direkte Konkurrenz zu der Methanogenese um die Substrate Acetat und Wasserstoff (Cappenberg und Prins 1974, Capone und Kiene 1988, Kuivila und Lovley 1996). Wenn nun das im Sediment vorhandene Sulfat reduziert worden ist, tritt für die methanogenen Prozesse keine Limitierung mehr auf. Die Nitrat- und Eisenreduktion hingegen ist in anderen Habitaten beobachtet worden (Westermann et al. 1987, Achtnich et al. 1995). Zusätzlich zu den genannten Abbauwegen besteht noch die Möglichkeit der syntrophen Acetatoxidation in Kombination mit der hydrogenotrophen Methanogenese (Zinder 1994). Eine Konkurrenz um das Substrat Wasserstoff wurde zwischen den Homoacetogenen und den Methanogenen beobachtet. Diese Konkurrenz war unter anderem durch die Temperatur beeinflusst. So wurde unter psychophilen Bedingungen H_2 schneller durch Homoacetogene verwertet als durch Methanogene (Conrad et al. 1986, Conrad und Wetter 1990, Conrad et al. 1989). Dieser Temperatureffekt kann sich dahingehend auswirken, dass bei niedrigen Temperaturen der Anteil der hydrogenotrophen Methanogenese gegenüber der acetoklastischen Methanogenese kleiner ist, als es bei höheren Temperaturen der Fall ist (Conrad et al. 1989, Kotsyurbenko et al. 1993, Nozhevnikova et al. 1994). Andererseits wurde auch in Seesedimenten beobachtet, dass das produzierte CH_4 auch ausschließlich aus H_2/CO_2 stammte (Jones et al. 1982, Galchenko 1994, Namsarev et al. 1995).

Bisherige Arbeiten, die sich mit der Methanbildung in Seesedimenten beschäftigten, wurden von verschiedenen Gesichtspunkten aus durchgeführt. Eine Fragestellung war, ob es Unterschiede in der Methanproduktion zwischen oligotrophen und eutrophen Seen gibt (Heyer und Babenzien 1985, Casper 1992, Casper 1996). Weiter wurden Untersuchungen über die Stoffwechselwege, die zur Methanbildung führen, durchgeführt (Koyama 1955, Winfrey und Zeikus 1978, Winfrey und Zeikus 1979, Lovley und Klug 1982, Lojen et al. 1999). Hierbei wurde der Einfluss des pH-Wertes, der Eintrag von Biomasse durch die Sedimentation und der Einfluss von Wasserstoff auf die Methanogenese genauer untersucht (Winfrey et al. 1977, Conrad et al. 1983, Phelps und Zeikus 1984, Phelps und

Zeikus 1985, Conrad et al. 1987). Da Sulfatreduzierer häufig in direkter Konkurrenz mit Methanogenen um die vorhandenen Substrate stehen, wurden die Wechselwirkungen zwischen diese beiden Organismengruppen in Seesedimenten genauer untersucht (Cappenberg 1974, Cappenberg und Prins 1974, Capone und Kiene 1988, Kuivila et al. 1989, Sinke et al. 1992, Kuivila und Lovley 1996, Takii et al. 1997). Der Einfluss der Temperatur auf die Methanbildung wurde hingegen nur in Lake Mendota, dem Bodensee und zwei schweizer Seen genauer untersucht (Zeikus und Winfrey 1976, Schulz und Conrad 1996, Nozhevnikova et al. 1997, Schulz et al. 1997).

Untersuchungen über eine jahreszeitliche abhängige Methanproduktion wurden bisher nur unter dem Gesichtspunkt der Isotopensignatur des gebildeten Methans durchgeführt (Burke et al. 1988, Burke et al. 1992, Avery et al. 1999). Die Bestimmung der Isotopensignatur wurde als eine weitere Möglichkeit gesehen, um die Herkunft des in Seesedimenten gebildeten Methans zu bestimmen (Schoell 1988, Schoell et al. 1988, Boschker et al. 1995, Thibodeau 1996) und - wenn möglich - die Ursachen von tages- und jahreszeitlichen Schwankungen der Methanproduktion zu erklären (Jedrysek 1995, 1999; Burke et al. 1992).

Über die Methanbildung in dem Profundalsediment des Plußsees wurden bis jetzt nur Versuche zur Substratabhängigkeit bei einer höheren Temperatur als der *in situ* Temperatur durchgeführt (Naguib 1982, 1988). Ebenso wurden schon Messungen zur CH₄-Konzentration im Sediment und zum Methanfluss aus dem Sediment durchgeführt (Adams und Naguib 1999). Untersuchungen über die Methanbildung im Sediment des Lake Kinneret wurden bis jetzt noch nicht durchgeführt. Im Gegensatz dazu wurde die Sulfatreduktion im Sediment genauer untersucht (Hades und Pinkas 1992, 1995 a und b).

Die Aufgabe dieser Arbeit ist nun, durch die Anwendung verschiedener analytischer und experimenteller Methoden herauszufinden, welchen Einfluss eine Erhöhung der Inkubationstemperatur über die *in situ* Temperatur auf die Methanbildung der zu untersuchenden Sedimente hat. Hierbei sollen die Stoffwechselwege, die den anaeroben Abbau der Biomasse durch Mikroorganismen bis zur Endstufe Methan und Kohlendioxyd durchführen, genauer analysiert werden. Diese Experimente sollen hierbei durch Anwendung verschiedener Techniken möglichst viele Gesichtspunkte erfassen.

Ziele der Arbeit

- Mittels Inkubation bei *in situ* Temperatur und einer höheren Temperatur soll der Einfluss der Inkubationstemperatur auf die Methanproduktion untersucht werden.
- Durch Hemmung der Methanbildung mit Bromethansulfonsäure, Methylfluorid und Chloroform sollen die Vorstufen, vor allem Acetat, Wasserstoff und andere Gärungsprodukte, aus denen Methan produziert wird, qualitativ und quantitativ erfasst werden.
- Eine thermodynamische Untersuchung der Zwischenstufen soll klären, ob die Stoffwechselwege energetisch möglich sind.
- Der Umsatz der detektierten Vorstufen und der Anteil der H₂/CO₂-abhängigen Methanogenese soll durch Experimente mit ¹⁴C-gelabelten Substraten bestimmt werden.
- Durch die Bestimmung der Isotopensignatur von CH₄ und CO₂ sollen weitere Hinweise auf die Substratabhängigkeit der Methanogenese gefunden werden.
- Durch Zugabe von organischen Substraten zu Sedimentaufschlämmungen soll der Einfluss dieser Substrate auf die Methanproduktion untersucht werden. Hierbei soll auch der Einfluss dieser Substrate auf die Isotopensignatur des gebildeten Methans und Kohlendioxyds untersucht werden.
- Für den Plußsee soll mit der Bestimmung der jahreszeitlich abhängigen Methankonzentrationen in der Wassersäule und dem jahreszeitlich abhängigen Methanfluss aus dem Sediment eine Massenbilanz für Methan im See durchgeführt werden.

2. Material und Methoden

2.1 Untersuchungsgebiete

2.1.1 Plußsee

Es wurden Sedimente aus zwei Seen, dem Plußsee und Lake Kinneret, untersucht. Das erste Untersuchungsgebiet war Profundalsediment aus dem Plußsee. Der Plußsee ist ein kleiner, dimiktischer eutropher Waldsee in der Nähe von Plön, Schleswig-Holstein (s. Anhang: Tabelle 1). Dieser See ist in der letzten Eiszeit entstanden und weist einen trichterförmigen Grund auf. Da der See keinen Zulauf in Form eines Baches oder Flusses besitzt, erfolgt der Wassereintrag nur durch Regen und den Zulauf von Oberflächenwasser. Aufgrund des kompletten Bewuchses des Ufers mit einem Mischwald findet ein stetiger Eintrag von Biomasse in den See statt. Dieses organische Material sedimentiert unter anderem auf dem Profundalsediment und verringert dadurch im Laufe der Zeit die Tiefe des Sees. Die Probennahmestelle lag am tiefsten Punkt in der Mitte des Sees. Das Wasser ist direkt über der Sedimentoberfläche das ganze Jahr strikt anoxisch und weist eine nahezu konstante Temperatur von 4-5 °C auf. Die limnologischen Charakteristika sind bei Overbeck und Chróst (1994) beschrieben.

2.1.2 Lake Kinneret

Als ein weiteres Untersuchungsobjekt wurde Sediment aus dem Lake Kinneret (See Genezareth) verwendet.

Lake Kinneret ist ein monomiktischer subtropischer See im Norden von Israel. Seine Charakterisierung innerhalb einer Trophiestufe liegt im mesotrophen Bereich mit mesooligotrophen Bedingungen im Sommer. Als Wasserzulauf dient der Fluss Jordan im Norden und zahlreiche Quellen auf den angrenzenden Golanhöhen (Gophen und Nishri 1994). Weitere Quellen, die zum Teil stark salz- und schwefelhaltig sind, befinden sich im gesamten Uferbereich des Sees. Wo möglich, wurden diese eingefasst und das Quellwasser um den See herum in den Ablauf des Sees im Süden wieder eingeleitet. Da der See der wichtigste Wasserspeicher des Landes ist, werden ganzjährig chemische und biologische Parameter bestimmt.

Durch die starke Umwälzung im Winter und Frühjahr gelangt sauerstoffreiches Wasser bis auf den Grund des Sees im Profundal, sodass die Wasserschicht direkt über dem Sediment oxisch wird. In der Stratifikationsphase hingegen wird die Wassersäule in den

unteren 20 m durch Sauerstoffverbrauch strikt anoxisch. Zusätzlich nimmt die H_2S -Konzentration in diesem Bereich zu.

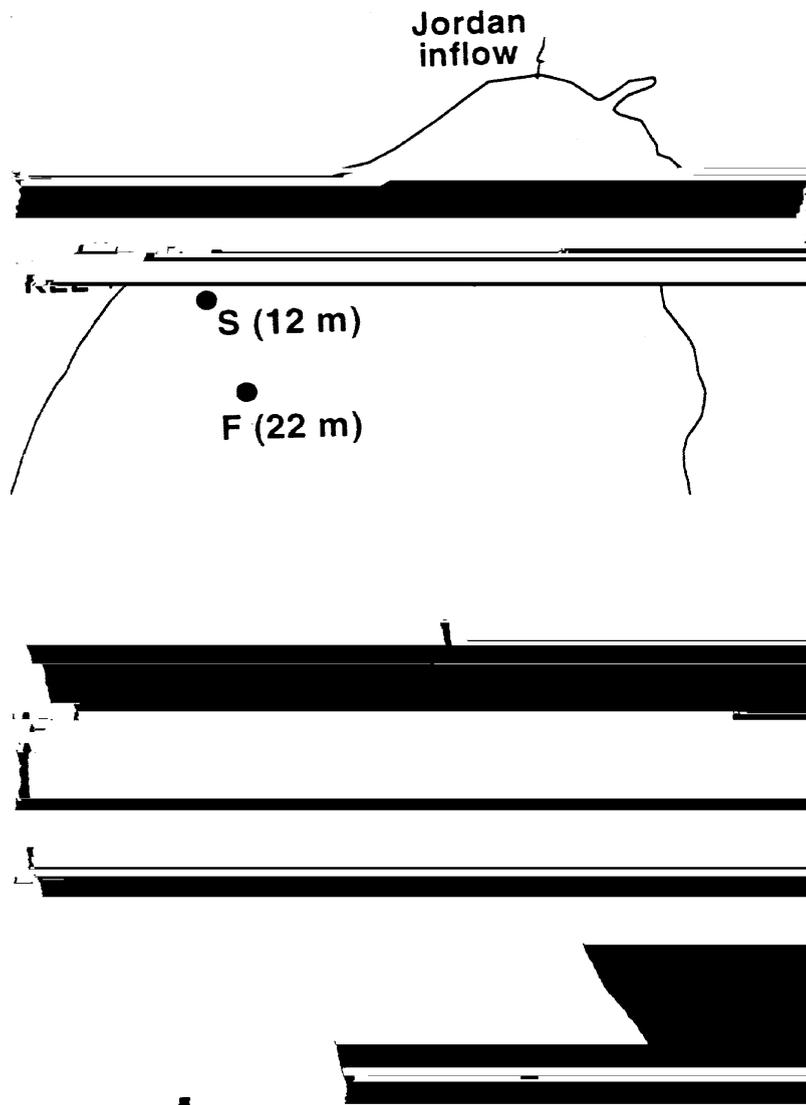


Abbildung 2: Lake Kinneret

Sedimentproben wurden an drei verschiedenen Standorten entnommen. Station A befindet sich an der tiefsten Stelle des Sees (Abbildung 2). Da der Wasserpegel des Sees stark schwankt, war im Jahr 1998 der See 40 m tief, im Jahr 1999 jedoch nur 38-39 m. Station F liegt nordwestlich von der Mitte in einer Tiefe von 19-22 m und somit im Übergangsbereich Profundal-Littoral. Station S liegt am Ufer in einer Tiefe von 8-10 m. Die Temperatur im Sediment bei Station A ist das ganze Jahr über nahezu konstant und beträgt 15-17°C. Die Temperaturen in den Sedimenten an den anderen zwei Stationen sind sowohl jahreszeitlich als auch tageszeitlich unterschiedlich und können innerhalb eines Tages bis zu 10°C differieren.

2.2 Probenentnahme

2.2.1 Probenentnahme von Profundalsediment aus dem Plußsee

Das Profundalsediment aus dem Plußsee wurde mit einem Ekman-Greifer aus einer Sedimenttiefe von 0-10 cm in einer Wassertiefe von 27 - 28,5 m entnommen und sofort in Flaschen blasenfrei abgefüllt und luftdicht verschlossen. Danach wurde es bei 4°C transportiert und gelagert.

Die chemischen Parameter des Sees wurden wöchentlich vom MPI in Plön bestimmt und konnten so für die vorliegende Arbeit übernommen werden.

Wasserproben, die zur Bestimmung des gelösten CH₄ verwendet wurden, wurden mit einem Ruttner-Schöpfer in Abständen von 1 m Tiefe aus der Wassersäule turbulenzfrei entnommen. Das Wasser wurde dann blasenfrei in 120 ml Serum-Flaschen gefüllt und diese luftdicht verschlossen. Die Flaschen wurden dann bei 4°C transportiert und bis zur Gasanalyse gelagert. Sedimentproben wurden im Jahr 1997 im Juni, August und November, 1998 im August, September, Oktober und November und 1999 im Januar und November entnommen. Wasserproben wurden nur 1998 und 1999 aus der Wassersäule entnommen.

2.2.2 Probenentnahme von Sediment aus dem Lake Kinneret

Sedimentproben aus dem Lake Kinneret wurden mit einem Ekman-Greifer aus den oberen 15 cm des Sedimentes bei den Stationen A, F und S entnommen und luftdicht in gasdichten Flaschen verschlossen.

Nach dem Transport bei Raumtemperatur von Israel nach Deutschland wurden die Flaschen in Deutschland bei 4°C bis zur Verwendung des Sedimentes gelagert.

Zusätzlich wurden mit einem Kernstecher aus Plexiglas (nach Tessenow et al., 1977) 30 cm tiefe Kerne aus dem Sediment bei Station A entnommen. Auf die Plexiglasröhre wurde eine Flächendichtung aufgeschraubt, die einen ungehinderten Wasserdurchfluss durch die Röhre beim Absenken des Stechers in das Sediment erlaubte. Beim Heraufziehen mittels einer Handwinde verschloss die Dichtung die Röhre. An Bord des Schiffes wurden die Röhren mit PVC-Schraubstopfen verschlossen und bis zur Verarbeitung bei 20°C im Dunkeln gelagert.

Sedimentproben wurden im Juli und August 1998 und im Mai, Juni und August 1999 genommen.

2.3 Verarbeitung des Sediments

Die am Lake Kinneret entnommenen Kerne wurden in Israel im Yigal Allon Kinneret Limnological Laboratory weiterverarbeitet. Dazu wurden die Plexiglasröhren in einem von Herrn W. Eckert entwickelten Kernschneider eingespannt. Unter ständiger N_2 -Begasung wurden nun die oberen 5 cm der Kerne in Schichten von 1 cm geschnitten und jede Schicht einzeln in gasdichte Kunststoff-Flaschen (PP, Nalge Nunc, Wiesbaden) eingefüllt. Die Flaschen wurden dann mit Argon gespült, sodass eine nahezu sauerstofffreie Atmosphäre hergestellt wurde. Die Sedimentsäule von 5 bis 20 cm wurde dann in Schichten von 3 cm Dicke geschnitten. Die Flaschen wurden dann bei 4°C bis zu ihrer Verwendung gelagert.

2.4 Analytische Methoden

2.4.1 Gaschromatische Analysen

2.4.1.1 Analyse von Methan und Kohlendioxid

Methan und Kohlendioxid wurde mit einem Gaschromatographen (GC) GC-8A der Firma Shimadzu (Kyoto, Japan) bestimmt.

Säule: Edelstahlsäule, 2 m lang, ϕ 1/8 Zoll, Trägermaterial:
Poropack QS 50/100 mesh, Betriebstemperatur: 40°C

Trägergas: Wasserstoff 5.0

Detektor: FID, Wasserstoff und FID-Gas als Brenngase,
Stickstoff dient als Quenchgas, Betriebstemperatur: 110°C

Methanisator: Eigenbau, Säule: NiCr-Ni-Katalysator (Firma Chrompack,
Middelburg, Niederlande)
Betriebstemperatur 350°C
Edelstahlsäule, Länge 20 cm, ϕ 1/8 Zoll

Nachweisgrenze: 1 ppmv CH_4 .

Die Gasproben wurden mit einer Pressure-Lock-Spritze (VICI, Baton Rouge LA USA) entnommen. Das Probenvolumen betrug 100 μ l. Als Eichgas wurde ein Gemisch aus 1000 ppmv CO , 1000 ppmv CO_2 und 1000 ppmv CH_4 der Firma Messer-Griesheim, Frankfurt eingesetzt. Die Auswertung der Messdaten erfolgte mit einem Integrator C-R A6 der Firma Shimadzu.

2.4.1.2 Analyse der Wasserstoffkonzentrationen

Zur Bestimmung von gasförmigem Wasserstoff wurden zwei Gaschromatographen verwendet. Für niedrige Wasserstoffkonzentrationen unter 200 ppmv wurde ein Gaschromatograph mit Reduktivgasdetektor (RGD2, TraceAnalytical, Techmation Vertriebsgesellschaft für Umweltanalytik mbH, Düsseldorf) eingesetzt.

Säule: Edelstahlsäule, 1.4 m lang, ϕ ½ Zoll, Trägermaterial: Molsieb
5Å, 80-100 mesh, Temperatur: 60°C

Trägergas: Synthetische Luft

Detektor: HgO-Detektor, Temperatur: 280°C

Nachweisgrenze: 1 ppmv H₂

Kalibriergas: 50 ppmv H₂ in Stickstoff

Für Wasserstoffkonzentrationen über 200 ppmv wurde ein Gaschromatograph GC-8A von Shimadzu mit einem Wärmeleitfähigkeitsdetektor (WLD) verwendet.

Säule: Edelstahlsäule, 2 m lang, ϕ 1/8 Zoll, Trägermaterial: Molsieb 5Å, 80-100 mesh, Temperatur: 80°C

Trägergas: Stickstoff 4.5

Detektor: WLD, Temperatur: 80°C

Kalibriergas: 1000 ppmv H₂ in Stickstoff.

Die Gasproben wurden mit einer Pressure-Lock-Spritze entnommen. Das Probenvolumen betrug 100 µl.

Die Auswertung der Messdaten erfolgte mit einem Integrator C-R A6 der Firma Shimadzu.

2.4.1.3 Messung von im Wasser gelöstem Methan

Für die Bestimmung des im Wasser gelösten Methans wurde das in Serumflaschen blasenfrei abgefüllte Wasser analysiert. Dazu wurde CH₄-freier N₂ mittels einer Kanüle in die Flasche injiziert. Durch den entstandenen Überdruck wurde parallel eine 10 ml-Spritze mit Wasser gefüllt. Dieses Wasser wurde dann in eine zuvor mit N₂ gespülte Flasche injiziert. Durch starkes Schütteln wurde dann das gelöste CH₄ und CO₂ ausgetrieben. 0,1 ml der Gasphase wurden zur Analyse im Gaschromatographen entnommen. Dieselbe Menge wurde für die Bestimmung von $\delta^{13}\text{CH}_4$ und $\delta^{13}\text{CO}_2$ verwendet.

2.4.2 Analyse organischer und anorganischer Verbindungen

2.4.2.1 Nachweis organischer Säuren und Zucker

Organische Säuren und Zucker wurden mittels einer HPLC-Analyse bestimmt.

Die Anlage bestand aus einer Pumpe SP1000 und einem Säulenofen S4110 (Sykam, Gilching).

Säule:	Edelstahlsäule, 30 cm lang, ϕ 7,8 mm
Trägermaterial:	ORH-801 Ion-exclusion form, H ⁺ (Interaction, Vertrieb Schambeck SFD GmbH, Bad Honnef)
Fließmittel:	1 mM Schwefelsäure
Fluss:	0,8 ml/min
Ofentemperatur:	60°C
Detektor:	Brechungsindex: RI-Detektor 2000F (Schambeck, Bad Honnef) Betriebstemperatur 40°C UV-Detektor Linear UVIS 200, Wellenlänge 205 nm
Nachweisgrenze:	2 μ M

Die Proben wurden mittels eines automatischen Probenaufgebers Jasco 851-AS (Firma Jasco, Japan) aufgegeben.

Die Auswertung der Messdaten erfolgte durch das Computerprogramm Peak Simple (SRI-Instruments, Torrence USA).

Lagen die Pool-Konzentrationen der Fettsäuren im Porenwasser unterhalb der Nachweisgrenze, wurden 2 ml Porenwasser in einem Gefriertrockner (Alpha 1-4; Christ, Osterode) aufkonzentriert und danach mit 200 μ l H₂O dest. wieder verflüssigt.

2.4.2.2 Analyse von Alkoholen

Alkohole wurden gaschromatographisch mit einem GC 8160 der Firma Carlo Erba Instrumentazione (Fisons, Hofheim) bestimmt:

Detektor:	FID, EL 980; 240°C
Säule:	SGE 3013BII; 25 m; Typ Bonded Phase; Material Fused Silica
Phase:	BP20 Polar; 60°C
Injektor:	Split 1:10; 120°C
Trägergas:	H ₂ 5.0
Nachweisgrenze:	50 μ M.

Aufgabe der Proben: Autosampler Combi Pal (CTC Analytics, Vertrieb Chromtech, Idstein Taunus).

Die Auswertung der Messdaten erfolgte mit einem Integrator C-R A6 der Firma Shimadzu.

2.4.2.3 Nachweis von Sulfat, Nitrat, Nitrit und Molybdat

Zur Bestimmung wurde ein Ionenchromatograph der Firma Sykam (Gilching) eingesetzt. Die Anlage bestand aus einer Pumpe S1000, einem Säulenofen S4110 mit einer Anionentrennsäule (LCA09, Sykam), einem Leitfähigkeitsdetektor S3110 zur Bestimmung von Sulfat und Molybdat, einem Suppressorsystem S2210, S6330 und einem nachgeschalteten UV/VIS-Detektor (UVIS 204, Firma Linear USA) zur Bestimmung von Nitrit und Nitrat. Die Proben wurden durch einen automatischen Probenaufgeber Jasco 851-AS (Firma Jasco, Japan) aufgegeben.

Säule:	Edelstahlsäule, 6 cm lang, ϕ 4,6mm
Trägermaterial:	Styrol/Divinobenzol, 10 μ m Korngröße
Fließmittel:	3 mM Natriumhydrogencarbonat 6 mM Natriumcarbonat
Fluss:	2 ml/min
Ofentemperatur:	65°C
Detektor:	UV-Detektor Linear UVIS 200, Wellenlänge 218 nm
Nachweisgrenze:	5 μ M

Die Datenauswertung erfolgte mit dem Integrationsprogramm Pyramid (Axxiom Chromatography Inc., USA)

2.5. Messung radioaktiver Isotope

2.5.1 Szintillationsmessungen

Zur Überprüfung der angesetzten radioaktiven Stammlösungen wurden diese nach ihrer Verdünnung in einem Szintillationsmessgerät Beckmann LS 6500 (München) untersucht. Dazu wurden zu 100 μ l der Stammlösung 15 ml Quickzint 501 (Zinsser, Frankfurt) gegeben und diese Mischung dann im Szintillationszähler gemessen.

Für die abschließende Bilanzierung nach Beendigung des Experimentes wurde aus den Ansatzflaschen 1 ml Sedimentsuspension entnommen und in 1 ml Reaktionsgefäße (Eppendorf, Hamburg) gefüllt. Danach wurde die Suspension für 10 min bei 13000 RPM abzentrifugiert. Aus dem Überstand wurden 100 μ l entnommen und dann wie oben beschrieben weiter analysiert.

2.5.2 Analyse von ^{14}C -Gasen mit einem Radioaktivitäts-Gas-Detektor (RAGA)

An einem GC (Shimadzu GC-8A) war nach dem Methanisator ein RAGA Typ IM 2026/2028 der Firma Raytest, Straubenhardt, so angeschlossen, dass der Gasstrom parallel im FID und in dem RAGA analysiert werden konnte.

Zählrohr: Durchflusszählrohr, 10 ml Volumen

Quenchgas: Methan

Nachweisgrenze: ca. 1500 dpm/ml.

Die Auswertung erfolgte über das Messprogramm der Firma Nuclear Interface.

Geeicht wurde mit einem $[^{14}\text{C}]$ Bicarbonatstandard. Dazu wurden aus der $[^{14}\text{C}]$ Bicarbonatstammlösung 100 μl in eine ausgeliterte mit 10 ml H_2O befüllte 120 ml Serumflasche gefüllt, die zuvor mit N_2 gespült und dann verschlossen war. Durch Zugabe von 1 ml 1M H_2SO_4 wurde alles gelöste Bicarbonat in gasförmiges CO_2 umgewandelt und dieses in der RAGA analysiert. Der $[^{14}\text{C}]$ Bicarbonatstandard wurde im Szintillationszähler gegengeeicht.

2.5.3 Analyse von radioaktiven Säuren

Die Analyse von ^{14}C -markierten Säuren in Porenwasser erfolgte mit einem Flüssigkeits-Szintilisator RAMONA 5 der Firma Raytest, Straubenhardt. Die Messzelle der RAMONA besteht aus einem Lithium-Glas-Szintillator mit einem Volumen von 400 μl . Die Nachweisgrenze lag bei ca. 2500 dpm/ml. Vor den Szintillator wurde eine HPLC vorgeschaltet, die eine Auftrennung in die einzelnen organischen Säuren und deren quantitative Analyse ermöglicht. Die HPLC besteht aus den gleichen Komponenten, wie in 2.4.2.1 beschrieben.

Die Auswertung erfolgte ebenso mit dem Computerprogramm Peak Simple.

2.6 Analyse der stabilen Isotopensignatur von CH₄, CO₂, organischer Säuren und Alkohole

Zur Bestimmung der stabilen Isotopensignatur von CH₄, CO₂, organischen Säuren und Alkoholen wurde ein GC-IRMS der Firma Finnigan (Thermoquest, Bremen) eingesetzt. Die Analysen wurden nach der Methode von Brand (1996) und Sugimoto (1991) durchgeführt.

Das Gerät besteht aus folgenden Komponenten:

IRMS:	Finnigan MAT delta plus (Bremen)
GC:	Hewlett Packard 6890 (Waldbronn)
Injektor:	Splitt/Splittless
Säule :	Pora PLOT Q, Länge 27,5 m, Ø 0,32 mm, Schichtdicke 10 µm (Chrompack, Frankfurt)
Messbedingungen:	Probenvolumen: 100-400 µl Split: Fluss = 10:1 Fluss: 2,6 ml/min Injektor-Temperatur: 150°C Ofentemperatur: 25°C Trärgas: Helium 4.6 Fluss: 2,6 ml min ⁻¹
GC/C interf.:	Standard GC Combustion Interface III, Oxidations Reaktor bei 940°C, Reduktions- Reaktor bei 650°C
Data System:	ISODAT TM (Finnigan, Bremen).

Der Arbeitsstandard war CO₂ 4.8, kalibriert gegen Pee Dee Belemnite Carbonat. Das Isotopen-Verhältnis wurde in der folgenden Schreibweise dargestellt:

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

Hierbei ist:

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

Die Präzision war bei wiederholter Injektion von 1,3 nmol CH₄ ± 0,2‰.

2.7 Verwendete Chemikalien und Gase

Die verwendeten Chemikalien besaßen den Reinheitsgrad "zur Analyse" und wurden von FLUKA AG (München) und Merck AG (Darmstadt) bezogen. Die eingesetzten technischen Gase stammten von Messer-Griesheim AG (Frankfurt). Die verwendeten ¹⁴C-markierten Substrate: Acetat, Methanol, Formiat, Propionat und Bicarbonat wurden von Hartmann (Braunschweig) und Amersham (Braunschweig) bezogen.

2.8 Durchgeführte Versuche

Die Versuche mit den Sedimenten aus dem Plußsee und Lake Kinneret wurden nach einem ähnlichen Schema durchgeführt. Unterschiede in der Vorgehensweise werden extra aufgeführt.

Für die Versuche wurden Sedimentaufschlammungen angesetzt. Als Inkubationsgefäße wurden sterile 120 bzw. 50 ml Serumflaschen verwendet. Das Sediment wurde aus der Lagerflasche mit einer Kolbenhubpipette entnommen und in die Serumflasche eingefüllt. In 120 ml Serumflaschen wurden 10 ml Sediment und in 50 ml Serumflaschen 5 ml Sediment eingefüllt. Danach wurde die gleiche Menge entgastes destilliertes Wasser dazugegeben, sodass eine 1:2 Verdünnung entstand. Nach dem Verschließen mit Butylgummistopfen wurden die Flaschen im Wechsel mit N₂ begast und mittels einer Vakuumpumpe evakuiert. Der Wechsel zwischen Be- und Entgasen wurde durch ein automatisches System durchgeführt, das aus einem Drucksensor, an dem man den maximalen Ober- und Unterdruck vorgibt, und einem Magnetventil besteht. Als maximaler Oberdruck wurden 0,5 bar und als Unterdruck -0,9 bar vorgegeben. Mittels dieses Systems wurde die Gasphase zehn mal gewechselt. Abschließend wurde ein Überdruck von 0,5 bar in den Flaschen eingestellt. Zum Austreiben des im Sediment gelösten Methans wurden dann die Flaschen bei 25°C für 1 h mit 120 RPM geschüttelt. Danach wurde die Gasphase noch einmal nach dem beschriebenen Schema ausgetauscht.

2.8.1 Bestimmung der Methanproduktionsraten

Zur Bestimmung der Methanproduktionsraten bei verschiedenen Temperaturen wurden Sedimentaufschlammungen wie oben beschrieben hergestellt und dann bei verschiedenen Temperaturen inkubiert.

Das Sediment aus dem Plußsee wurde bei 4°C bzw. 25°C inkubiert, während das Sediment aus Lake Kinneret bei 15°C und 30°C inkubiert wurde. In einem Vorversuch wurden außerdem die Methanproduktionsraten im Lake Kinneret Sediment bei 10°C, 15°C, 25°C und 30°C bestimmt.

Teilweise wurden die Methanproduktionsraten noch in Israel bestimmt.

Für die Gasanalyse wurden in regelmäßigen Abständen Gasproben entnommen und diese auf ihre Konzentrationen von CH₄, CO₂ und H₂ analysiert.

2.8.2 Hemmung der Methanogenese mit verschiedenen Hemmstoffen

Um die Methanogenese selektiv zu hemmen, wurden verschiedene Hemmstoffe verwendet. Als universeller Hemmstoff wurde Chloroform eingesetzt. Dieser hemmt zwar überwiegend die Methanogenen, kann aber auch Homoacetogene und Sulfatreduzierer hemmen (Scholten et al. 2000). Für die Ansätze mit Chloroform wie auch für die Ansätze mit den anderen Hemmstoffen wurden Sedimentaufschlammungen in 50 ml Serumflaschen wie oben beschrieben vorbereitet. Nach dem Wechsel der Gasphase wurde dann Chloroform mittels einer Mikroliter-Spritze direkt zugegeben. Bei Sedimentaufschlammungen des Plußsees wurden Endkonzentrationen von 0,1 mM Chloroform eingestellt. Bei den Ansätzen mit Sediment aus Lake Kinneret wurde Chloroform bis zu einer Endkonzentration von 0,1 mM bei 30°C bzw. 0,2 mM bei 15°C zugegeben. Parallel zu den Ansätzen mit Chloroform-Zugabe wurden Kontrollansätze ohne Zugabe eines Hemmstoffes angesetzt.

Als ein spezifischer Hemmstoff der Methanogenese wurde Bromethansulfonsäure als Natriumsalz (BES) verwendet. Diese ist ein Analogon zu Coenzym M und vermag dadurch die Methyl-Reduktion und das Wachstum der Methanogenen zu hemmen (Brock et al. 1994). Für das Hemmexperiment wurde eine 1 M Stammlösung BES hergestellt, die vor der Zugabe zu den Sedimentaufschlammungen entgast wurde. Es wurden zwischen 10 mM (Plußsee) und 25 mM (Lake Kinneret) in die Flaschen gegeben (Endkonzentration). Ebenso wurden Kontrollansätze ohne Zugabe von BES angesetzt.

Als ein spezifischer Hemmstoff der acetoklastischen Methanogenen wurde Methylfluorid (CH_3F) verwendet (Frenzel und Bosse 1996, Janssen und Frenzel 1997). Es wurde als gasförmige Substanz (99% ABCR Fluorchemicals, Karlsruhe) dazugegeben und zwar in den Konzentrationen von 1 - 3,5 % (v/v). Diese Konzentration wurde mittels einer gaschromatischen Analyse überprüft. In Vorversuchen wurde die für das jeweilige Sediment optimale Hemm-Konzentration an CH_3F ermittelt.

In den Experimenten wurden nun so viele Sedimentaufschlämmungen angesetzt, dass für jeden Zeitpunkt der Probennahme drei Parallelen zur Verfügung standen. Diese wurden dann nach der Gasanalyse und der Entnahme der Porenwasserprobe vernichtet. Somit wurde eine Veränderung der Gasphase durch die kontinuierliche Entnahme von Porenwasser in einer Serumflasche verhindert.

2.8.3 Zugabe von organischen Substanzen

Zur Stimulation der Methanproduktion wurden verschiedene organische Substanzen zu vorbereiteten Ansätzen dazugegeben. So wurden jeweils separat Acetat, Methanol, Formiat und Propionat in Konzentrationen von 0,75-1 mM (Endkonzentration) dazugegeben. Nach der Zugabe wurde die Methanproduktion untersucht. In einigen Versuchen wurden zusätzlich Porenwasserproben aus den Sedimentaufschlämmungen entnommen und diese auf organische Säuren untersucht.

Um einen Einfluss der zugegebenen Substrate auf die Isotopensignatur von CH_4 und CO_2 zu untersuchen, wurden Gasproben in regelmäßigen Abständen entnommen und diese mittels des GC-IRMS analysiert.

2.8.4 Zugabe von Wasserstoff

Wasserstoff wurde als ein Substrat der Methanogenen zu vorbereiteten Sedimentaufschlämmungen dazugegeben. Hierzu wurde nach Austausch der Gasphase H_2 in die Gasphase der Serumflaschen in einer Konzentration von 4% (v/v) injiziert. Wie auch schon bei den Ansätzen mit zugegebenen organischen Substanzen wurde auch hier die Methanproduktion und die Isotopensignatur von CH_4 und CO_2 bestimmt.

2.8.5 Zugabe von Glukose und Pectin

Als universelles Substrat für Bakterien wurde Glukose in vorbereitete Sedimentaufschlammungen nach dem zweiten Begasen in einer Endkonzentration von 10 mM dazugegeben. In bestimmten Zeitabständen wurden dann Porenwasserproben entnommen und diese in der HPLC auf ihre Zusammensetzung an organischen Säuren analysiert. Zusätzlich wurde die Gasphase analysiert.

Für den Ansatz mit Pectin als Substrat wurde aus einer 5 %igen Pectinlösung soviel Pectin in die Ansätze dazugegeben, bis eine Endkonzentration von 1,0 % (w/v) erreicht war. Die Analyse der Gas- und Flüssigphase wurde genauso wie bei den Ansätzen mit Glukose als Substrat durchgeführt.

2.8.6 Versuche mit radioaktiv markierten Substraten

2.8.6.1 Bestimmung des Umsatzes von Acetat mittels [2-¹⁴C]Acetat

Für die Radioaktivexperimente wurden anstatt Serumflaschen 25ml Kulturröhrchen verwendet. Als Inokulum wurde die gleiche Menge wie in den 50 ml Serumflaschen (5 ml Sediment + 5 ml H₂O) eingesetzt. Die Vorbereitung der Kulturröhrchen wurde auf die gleiche Weise durchgeführt wie bei den Serumflaschen. Die Inkubation erfolgte dann bei denselben Temperaturen, bei denen die anderen Experimente durchgeführt wurden.

Wurde Sediment aus dem Plußsee verwendet, so wurde direkt nach dem zweiten Begasen 1 ml [2-¹⁴C]Acetat in einer Menge von 6 Mdpm (58 mCi mmol⁻¹) in die Kulturröhrchen injiziert. Der Umsatz des zugegebenen [2-¹⁴C]Acetats zu ¹⁴CH₄ und ¹⁴CO₂ wurde dann durch die Analyse der Gasphase dokumentiert. In einem separaten Experiment wurde auch der Umsatz von [1-¹⁴C]Acetat im Plußsee durch die Zugabe von 0,5 ml [1-¹⁴C]Acetat in einer Menge von 2,5 Mdpm (59 mCi mmol⁻¹) untersucht.

Da im Sediment aus Lake Kinneret nicht auszuschließen war, dass das zugegebene [2-¹⁴C]Acetat nicht nur durch Methanogene verwendet wurde, sondern auch durch andere Bakterien verwendet werden konnte, wurden die Kulturröhrchen nach dem zweiten Begasen ohne Zugabe von Substrat vorinkubiert. Die 30°C-Ansätze [1

vorinkubiert, während die 15°C-Ansätze mindestens 48 h vorinkubiert wurden. Um einen Einfluss der Dauer der Vorinkubation auf den respiratorischen Index (RI) zu bestimmen, wurden Kulturröhrchen vorbereitet und diese als Triplikate im Zeitraum von 0 bis 14 d vorinkubiert. Alle 24 h wurde jeweils der Umsatz von [2-¹⁴C]Acetat in jeweils einem Satz der Triplikate bestimmt.

Acetat ist außer für die Methanogenen noch für andere Bakterien ein wichtiges Substrat. So kann es unter Reduktion von Elektronenakzeptoren wie Nitrat, Sulfat und Fe³⁺ oxidiert werden. Eine zusätzliche Möglichkeit besteht in der syntrophen Oxidation von Acetat, wobei dann das aus Acetat produzierte H₂ und CO₂ von Methanogenen weiter verwendet werden kann (Zinder 1994). Der RI liegt für die methanogene Verwertung von Acetat um 0,2 (Conrad und Schütz 1988). Wird jedoch Acetat von anderen Bakterien verbraucht, liegt der Wert über 0,2.

Die Bestimmung des RI-Wertes erfolgte nach Beendigung des Umsatzes von [2-¹⁴C]Acetat. Hierzu wurde 1 ml 1 M H₂SO₄ in die Kulturröhrchen injiziert. Nach einer guten Durchmischung, welche eine Überführung des gelösten CO₂ in die Gasphase bewirkt, wurde die Konzentration des totalen ¹⁴CO₂ bestimmt.

2.8.6.2 Umsatz von [¹⁴C]Bicarbonat

Um den Anteil von H₂/CO₂ an der Gesamtmethanproduktion zu bestimmen, wurden Experimente durchgeführt, bei denen [¹⁴C]Bicarbonat zugegeben wurde. Hierzu wurde nach dem zweiten Begasen der Kulturröhrchen 1 ml NaH¹⁴CO₃ in einer Menge von 10 Mdpm (54 mCi mmol⁻¹) in die Kulturröhrchen injiziert. Danach wurde in regelmäßigen Abständen die Gasphase analysiert. Mittels des fFaktors (Berechnung 2.9.4.3) konnte dann der Anteil von H₂/CO₂ an der Gesamtmethanbildung berechnet werden.

2.8.6.3 Umsatz von [¹⁴C]Methanol und [¹⁴C]Formiat

Zur Überprüfung, ob außer Acetat und H₂/CO₂ noch Methanol und Formiat bei der Methanogenese eine Rolle spielen, wurde der Umsatz von [¹⁴C]Methanol und [¹⁴C]Formiat untersucht.

Mit dem Plußseesediment wurde der Umsatz von [¹⁴C]Methanol und [¹⁴C]Formiat untersucht. Hierzu wurde nach der Vorbereitung der Kulturröhrchen 0,5 ml mit 2,5 Mdpm [¹⁴C]Methanol mit einer Aktivität von 55 mCi mmol⁻¹ in die Röhrchen injiziert. Für die [¹⁴C]Formiat-Experimente wurden 1 ml mit 6 Mdpm [¹⁴C]Formiat mit einer Aktivität von 55 mCi mmol⁻¹ in die Röhrchen injiziert. Danach wurde der Umsatz der zugegebenen Substanzen durch Gasanalysen dokumentiert.

2.9 Berechnungen

2.9.1 Ratenberechnungen

Die Produktionsraten von Methan wurden ermittelt, indem man eine Ausgleichsgerade in die Konzentrationsgerade legte und deren Steigung berechnete.

Für die Gase Methan und Kohlendioxyd mussten die Konzentrationsangaben (ppmv), die man durch die Messungen am GC erhielt, in die Stoffmenge (μmol) umgerechnet werden.

Hierzu wurde die Zustandsgleichung idealer Gase nach der Stoffmenge n hin umgeformt.

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

n: Stoffmenge [mol]

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

V: Volumen des Gasraumes im Reaktionsgefäß [l]

R: allgemeine Gaskonstante ($0,083144 \text{ [l bar K}^{-1} \text{ mol}^{-1}]$)

T: Temperatur bei 4°C ($277,15^\circ\text{K}$), 15°C ($288,15^\circ\text{K}$), 25°C ($298,15^\circ\text{K}$) und 30°C ($303,15^\circ\text{K}$)

Für die Produktionsrate wurde das Ergebnis noch durch das Volumen (cm^3) der Sedimentaufschlammung und die Zeit dividiert. Wurden die Produktionsraten bezogen auf das tatsächliche Volumen des Sedimentes angegeben, so wurde das Ergebnis nur durch das Volumen des tatsächlich zugegeben Sedimentes und die Zeit dividiert.

2.9.2 Partialdruck von Wasserstoff

Die gemessenen Wasserstoffkonzentrationen (ppmv) wurden in den jeweiligen Partialdruck (PA) umgeformt.

Für Umrechnungen in mol wurden die Konzentrationen wie in 2.9.1 beschrieben umgerechnet.

2.9.3 Berechnung des vertikalen diffusiven Flusses und der Verweilzeit von Methan im Plußsee

Mittels der gemessenen Konzentrationsprofile von CH₄ im Plußsee konnte die Diffusion von CH₄ im zeitlichen Verlauf von August 1998 bis Januar 1999 bestimmt werden.

Die Berechnung der Diffusion erfolgte nach dem 1. Fick'schen Gesetz:

$$F = D_e \left(\frac{\Delta C}{\Delta z} \right) \quad (2)$$

D_e: effektiver Diffusionskoeffizient von CH₄ in Wasser (cm² s⁻²)

F: Diffusionsfluss, berechnet aus der Produktionsrate im Profundal Sediment am Tag der Probenentnahme (μmol cm⁻² s⁻¹)

$\frac{\Delta C}{\Delta z}$: Konzentrationsgefälle berechnet aus der linearen Regression der CH₄-Konzentrationen (C) in der Wassersäule bezogen auf die Tiefe (z) (nM cm⁻¹).

Die Verweilzeit (τ) von CH₄ in der Wassersäule wurde mit folgender Gleichung berechnet:

$$t = \frac{M}{F} \quad (3)$$

M: totale Menge von CH₄ in der Wassersäule (μmol cm⁻²)

F: Fluss des Methans aus dem Sediment (nmol d⁻¹ cm⁻²).

2.9.4 Berechnungen für die radioaktiven Versuche

2.9.4.1 Berechnung des respiratorischen Index (RI) für die Umsetzung von [2-¹⁴C]Acetat und [¹⁴C]Methanol

Der respiratorische Index wurde mit folgender Formel berechnet:

$$RI = \frac{{}^{14}CO_2}{{}^{14}CO_2 + {}^{14}CH_4} \quad (4)$$

Die Konzentrationen von ¹⁴CH₄ und ¹⁴CO₂ werden in dpm angegeben.

2.9.4.2 Berechnung der Umsatzrate von [2-¹⁴C]Acetat und [¹⁴C]-Methanol zu ¹⁴CH₄ und ¹⁴CO₂

Die Umsatzzeit von [2-¹⁴C]Acetat und [¹⁴C]Methanol in ¹⁴CH₄ und ¹⁴CO₂ wurde durch eine logarithmische Anpassung der Substrate durch die gebildeten Produkte mit der Zeit berechnet (Phelps und Zeikus 1984). Dabei wurde angenommen, dass der erhaltene maximale Wert von ¹⁴CH₄ und ¹⁴CO₂ zu 100 % mit der Menge an für Bakterien verfügbarem Acetat bzw. Methanol übereinstimmend sei:

$$T_t = t / \ln \left(1 - \frac{\text{dpm von } ^{14}\text{CO}_2 + ^{14}\text{CH}_4}{\text{Maximum dpm von } ^{14}\text{CO}_2 + ^{14}\text{CH}_4} \right) \quad (5)$$

Hierbei ist:

T_t : Umsatz Zeit (h⁻¹) bzw. (min⁻¹)
 t : Versuchsdauer (min bzw. h).

Die weiteren Berechnungen erfolgten dann nach Schütz et al.(1989).

Die Umsatzrate wurde dann mittels der im Sediment vorhandenen Substratkonzentration c_{Substrat} , die sich entweder auf Acetat (c_{Ac}) oder Methanol (c_{Me}) bezog und der Umsatz-Zeit T_t (Gleichung 4), berechnet:

$$v_{\text{Substrat}} = (c_{\text{Substrat}} / T_t) \left(\frac{\text{Maximum dpm von } ^{14}\text{CO}_2 + ^{14}\text{CH}_4}{\text{Total dpm des zugesetzten } ^{14}\text{C-Substrates}} \right) \quad (6)$$

v_{Substrat} : Umsatz-Rate (nmol h⁻¹ cm⁻³) bzw. (nmol min⁻¹ cm⁻³) von Acetat (v_{Ac}) und Methanol (v_{Me}).

Die Rate der Substrat-abhängigen CH₄-Bildungsrate (p_{Substrat}) wurde mittels der Umsatz-Rate (Gleichung 6) und dem Respiratorischen Index (Gleichung 4) berechnet.

$$P_{\text{Substrat}} = v_{\text{Substrat}} (1 - RI) \quad (7)$$

p_{Substrat} : Rate der CH₄-Produktion aus den Substraten Acetat (p_{Ac}) und Methanol (p_{Me}) (nmol h⁻¹ cm⁻³) bzw. (nmol min⁻¹ cm⁻³).

2.9.4.3 Berechnung des f-Faktors

Mittels des f-Faktors lässt sich der Anteil von H_2/CO_2 an der gesamten Methanproduktion darstellen. Dazu wird die spezifische Radioaktivität von $^{14}CH_4/CH_4$ und $^{14}CO_2/CO_2$ miteinander verrechnet.

$$f = \frac{SR_{CH_4}}{SR_{CO_2}} \quad (8)$$

SR_{CH_4} : Spezifische Radioaktivität von CH_4

SR_{CO_2} : Spezifische Radioaktivität von CO_2 .

2.9.5 Berechnungen der Isotopensignatur von CH_4 und CO_2

Durch die Bestimmung von $\delta^{13}CH_4$ und $\delta^{13}CO_2$ ist es möglich einen Hinweis auf das für die Methanproduktion von den Methanogenen verwendete Substrat zu bekommen. Dazu wurde der Fraktionierungs-Faktor aus den $\delta^{13}CH_4$ - und $\delta^{13}CO_2$ -Werten nach Whiticar et al. (1986) berechnet:

$$a_c = \frac{(d^{13}CO_2 + 10^3)}{(d^{13}CH_4 + 10^3)} \quad (9)$$

2.9.6 Thermodynamische Berechnungen

Für die Berechnung der freien Enthalpie (Gibbs Free Energy, ΔG) wurden die Konzentrationen der analysierten Gase und gelösten Komponenten verwendet. ΔG wurde für die Methanogenese aus verschiedenen Substraten, die Homoacetogenese und den syntrophen Acetatverbrauch berechnet (Conrad et al. 1986). Die Gibbssche freie Standard Enthalpie (ΔG°) wurde aus den Änderungen der freien Bildungsenthalpien (ΔG^f) der Reaktanten und Produkte berechnet (Thauer et al. 1977). Die ΔH^0 -Werte stammen aus

Tabelle 1: Reaktionen der Methanbildung, der Homoacetogenese und des syntrophen Acetatabbaues (kJ/mol Reaktion)

Reaktion	ΔH° (kJ/mol)	ΔG° (kJ/mol)
(1) $4 \text{ H}_2 + 2 \text{ CO}_2 \Rightarrow \text{CH}_3\text{COO}^- + \text{H}^+ + 2 \text{ H}_2\text{O}$	-270,6	-55,2
(2) $4 \text{ H}_2 + \text{ CO}_2 \Rightarrow \text{CH}_4 + 2 \text{ H}_2\text{O}$	-252,9	-130,7
(3) $\text{CH}_3\text{COO}^- + \text{H}^+ \Rightarrow \text{CH}_4 + \text{ CO}_2$	-17,7	-75,7
(4) $\text{CH}_3\text{COO}^- + \text{H}^+ \Rightarrow 2 \text{ CO}_2 + 2 \text{ H}_2$	270,6	55,2
(5) $4 \text{ CH}_3\text{OH} \Rightarrow 3 \text{ CH}_4 + \text{ CO}_2 + 2 \text{ H}_2\text{O}$	-206,3	-319,4

Für die Berechnungen wurden folgende Zustände angenommen:

gasförmiger Zustand:	$\text{CH}_4, \text{CO}_2, \text{H}_2$
flüssiger Zustand:	H_2O
gelöster Zustand	$\text{CH}_3\text{COOH}, \text{CH}_3\text{OH}.$

Da die Versuche der zwei Sedimente nicht nur bei 25°C, sondern auch bei 4°C, 15°C und 30°C durchgeführt wurden, wurden die ΔG° -Werte in Abhängigkeit von der Temperatur korrigiert. Diese ΔG_T° -Werte wurden nach der Van't Hoff-Gleichung (Conrad und Wetter 1990) berechnet.

$$\frac{d \ln K}{dT} = \frac{\Delta H^0}{RT^2} \quad (10)$$

Diese Gleichung wurde integriert nach:

$$\ln K = -\frac{\Delta H^0}{RT} + B \quad ; \quad (11)$$

hierbei ist

$$\Delta G_T^0 = -RT \ln K ; \quad (12)$$

umgeformt bedeutet dies:

$$\Delta G_T^0 = \Delta H^0 - RBT . \quad (13)$$

Die Konstante B kann nun aus Gleichung 11 berechnet werden mit $T = 298,15 \text{ K}$ und ΔG^0 . Zu beachten ist, dass die Wärmekapazität (c_p) und die Änderung der Enthalpie ΔH^0

unabhängig über einen Bereich von 0°C bis 100°C sind. RB entspricht in diesem Fall der Änderung der Entropie ΔS^0 . Mittels dieser Umrechnung erhielt man die ΔG°_T -Werte für die Inkubationen bei 4°C, 15°C und 30°C (Tabelle 2).

Tabelle 2: ΔG°_T korrigiert für Inkubationen bei 4°C, 15°C und 30°C

Reaktion	ΔG°_4 (kJ)	ΔG°_{15} (kJ)	ΔG°_{30} (kJ)
(1) $4 \text{ H}_2 + 2 \text{ CO}_2 \Rightarrow \text{CH}_3\text{COO}^- + \text{H}^+ + 2 \text{ H}_2\text{O}$	-70,4	-62,4	-51,6
(2) $4 \text{ H}_2 + \text{ CO}_2 \Rightarrow \text{CH}_4 + 2 \text{ H}_2\text{O}$	-139,9	-135,1	-128,9
(3) $\text{CH}_3\text{COO}^- + \text{H}^+ \Rightarrow \text{CH}_4 + \text{ CO}_2$	-71,61	-73,7	-76,7
(4) $\text{CH}_3\text{COO}^- + \text{H}^+ \Rightarrow 2 \text{ CO}_2 + 2 \text{ H}_2$	70,4	62,4	51,6
(5) $4 \text{ CH}_3\text{OH} \Rightarrow 3 \text{ CH}_4 + \text{ CO}_2 + 2 \text{ H}_2\text{O}$	-304,4		

3. Ergebnisse

3.1 Methanproduktion im eutrophen Plußsee: jahreszeitliche Änderungen, Einfluss der Temperatur und Stoffwechselprozesse im Profundal Sediment

Die vorliegenden Ergebnisse sind sich zum größten Teil in der folgenden Veröffentlichung publiziert: Methane production in eutrophic Lake Plußsee: seasonal change, temperature effect and metabolic processes in the profundal sediment. Hier werden lediglich die wichtigsten Ergebnisse vorgestellt.

Zur Bestimmung der CH₄-Produktionsraten im Plußsee wurden zu verschiedenen Zeitpunkten Sedimentproben aus dem Profundalsediment entnommen und diese bei 4°C bzw. 25°C inkubiert. CH₄ wurde bei beiden Inkubationstemperaturen produziert, wie man in den Abbildungen Anhang 1 A und 1 B beispielhaft sieht. Hierbei ist deutlich zu sehen, dass bei einer Inkubationstemperatur von 25°C mehr Methan produziert wurde als bei einer Inkubationstemperatur von 4°C. Eine jahreszeitliche Abhängigkeit der Methanproduktion konnte über einen Zeitraum von einem Jahr beobachtet werden (Anhang Abbildung 2). Es findet eine Erhöhung der Raten vom Frühjahr bis zum August sowohl bei den Inkubationen bei 4°C als auch bei den Inkubationen bei 25°C statt. Danach nehmen die Produktionsraten wieder ab und haben ihr Minimum im November/ Dezember. Diese jahreszeitliche Abhängigkeit der Methanproduktionsraten für das Jahr 1998 wurde teilweise auch im Folgejahr beobachtet. Durch diese Feststellung, dass sich die Methanproduktionsraten in Abhängigkeit der Jahreszeit verändern, wurde in den folgenden Experimenten untersucht, inwieweit sich diese verschiedenen CH₄-Produktionsraten auf den Methanfluss im See vom Sediment über das Hypolimnion bis in das Epilimnion auswirken. Dazu wurden verschiedene CH₄-Konzentrationsprofile in der Wassersäule erstellt (s. Anhang: Abbildung 3). Man kann sehen, dass sich die CH₄-Konzentrationen in Abhängigkeit von der Jahreszeit ändern. So wurde die höchste CH₄-Konzentration im Oktober gemessen und die niedrigste im Januar. Zusätzlich zu den CH₄-Konzentrationen wurde der O₂-Gehalt in der Wassersäule von Mitarbeitern des MPI in Plön gemessen. Es wurde hierbei festgestellt, dass in und oberhalb der Zone, wo die CH₄-Konzentrationen nahe 0 gehen, noch O₂ im Wasser vorhanden war. Mittels dieser CH₄-Konzentrationsprofile wurde dann der Methanfluss berechnet. Es konnte hierbei auch eine

jahreszeitliche Abhängigkeit festgestellt werden, da der Methanfluss mit $8,27 \text{ pmol cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$ im August 1998 am höchsten im Vergleich zum Fluss von $0,89 \text{ pmol cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$ im September 1998 war (s. Anhang: Tabelle 4). Diese jahreszeitliche Abhängigkeit wurde auch bei der Bestimmung der Diffusionskoeffizienten, berechnet aus dem Methanfluss, festgestellt. So war der Diffusionskoeffizient mit $0,112 \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ im August 1998 10-fach so groß wie mit $0,010 \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ im September 1998.

Da im Profundalsediment als einzige freie Fettsäure nur Acetat detektiert werden konnte ($5,65 \pm 4,58 \text{ nmol cm}^{-3}$ Sediment), wurde untersucht, inwieweit es durch eine Hemmung der Methanogenese zu einer Akkumulation von Acetat kommen konnte. Dazu wurden BES und Methylfluorid als Hemmstoffe eingesetzt. Wurden 10 mM BES dazugegeben, kam es zu einer vollständigen Hemmung der Methanogenese sowohl bei 25°C als auch bei 4°C (Abbildung 3).

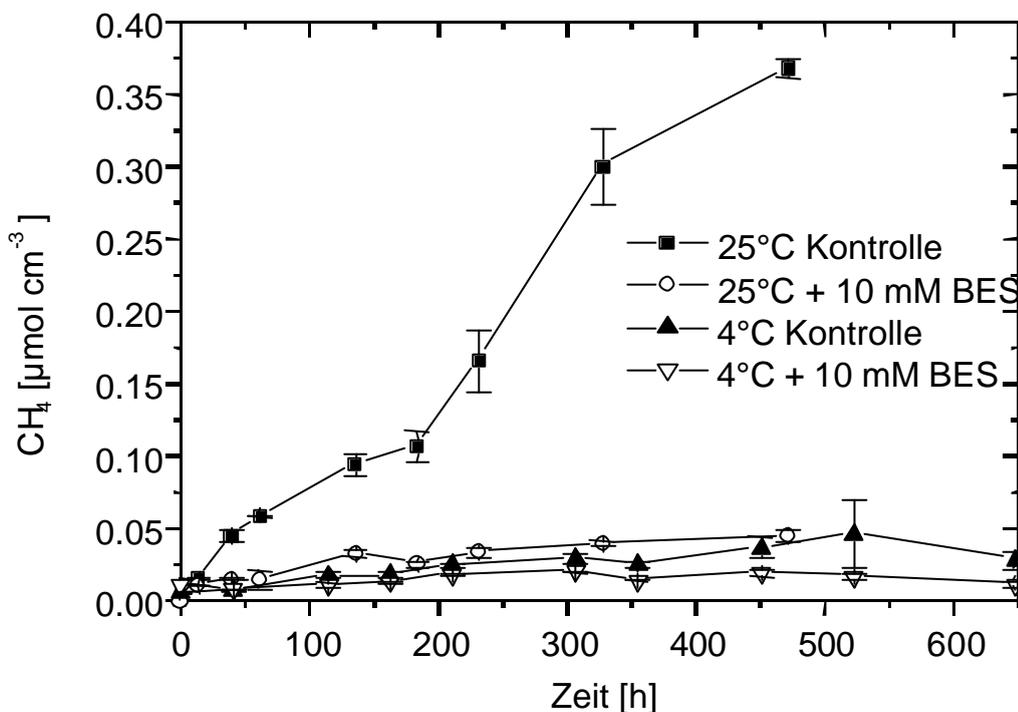


Abbildung 3: CH_4 -Produktion [$\mu\text{mol cm}^{-3}$] in Sedimentaufschlämmungen nach Zugabe von 10 mM BES. Profundalsediment des Plußsees vom 26.01.1999. Daten zeigen Mittelwerte von 3 parallelen Ansätzen \pm Standardfehler

Nur in den Ansätzen, die bei 25°C inkubiert worden waren, wurde eine Acetat-Akkumulation beobachtet.

Wurde CH_3F als Hemmstoff verwendet, dann wurde nur die acetoklastische Methanogenese gehemmt, was durch die Akkumulation von Acetat und einer teilweisen Hemmung der Methanproduktion gezeigt wurde (s. Anhang: Abbildung 4). Die Bilanzierung

ergab, dass $104 \% \pm 100 \%$ der Menge des akkumulierten Acetats equivalent der Menge akkumuliertem Methan waren, die in den ungehemmten Kontrolle produziert worden war.

Zur Bestimmung des Anteils der hydrogenotrophen Methanogenese an der Gesamtmethanogenese wurden Experimente durchgeführt, bei denen [^{14}C]Bicarbonat in vorbereitete Sedimentaufschlammungen dazugegeben wurde.

Wurden die Sedimentaufschlammungen bei 25°C inkubiert, dann wurde [^{14}C]Bicarbonat nach einer lag-Zeit von 150 h zu $^{14}\text{CH}_4$ umgesetzt (s. Anhang: Abbildung 5). Der Anteil der Methanbildung aus H_2/CO_2 betrug zuerst 25 % und stieg dann im Laufe der Inkubation auf 42 % an. Wurde dieser Versuch bei 4°C durchgeführt, konnte keine Produktion von $^{14}\text{CH}_4$ beobachtet werden.

Mittels der Zugabe von [$2\text{-}^{14}\text{C}$]Acetat wurde der Acetatumsatz im Profundalsediment untersucht. Abbildung 6 im Anhang zeigt den Umsatz zu $^{14}\text{CH}_4$ und $^{14}\text{CO}_2$ bei einer Inkubation bei 25°C (6 A) und bei 4°C (6 B). Mittels dieser gemessenen Umsatzdaten wurden dann die Umsatzzeit (T_i) und die Umsatzrate (V_{ac}) von Acetat berechnet (s. Anhang: Tabelle 6). Wurden die Experimente bei 4°C durchgeführt, dann war die Umsatzzeit deutlich größer als bei den Inkubationen bei 25°C . Bei beiden Temperaturen war die acetatabhängige Methanbildungsrate deutlich niedriger als die Gesamtmethanbildungsrate. In einem weiteren Experiment wurde der Umsatz von [$1\text{-}^{14}\text{C}$]Acetat untersucht. Hierbei wurde ebenso wie bei der Zugabe von [^{14}C]Bicarbonat nur bei den 25°C -Ansätzen eine Bildung von $^{14}\text{CH}_4$ beobachtet (s. Anhang: Abbildung 7). Das gleiche Ergebnis wurde beobachtet, als [^{14}C]Formiat verwendet wurde.

Unter der Annahme, dass Methanol ein mögliches Substrat für die Methanogenese im Plußsee ist (Naguib 1982), wurde der Umsatz von Methanol mit [^{14}C]Methanol untersucht.

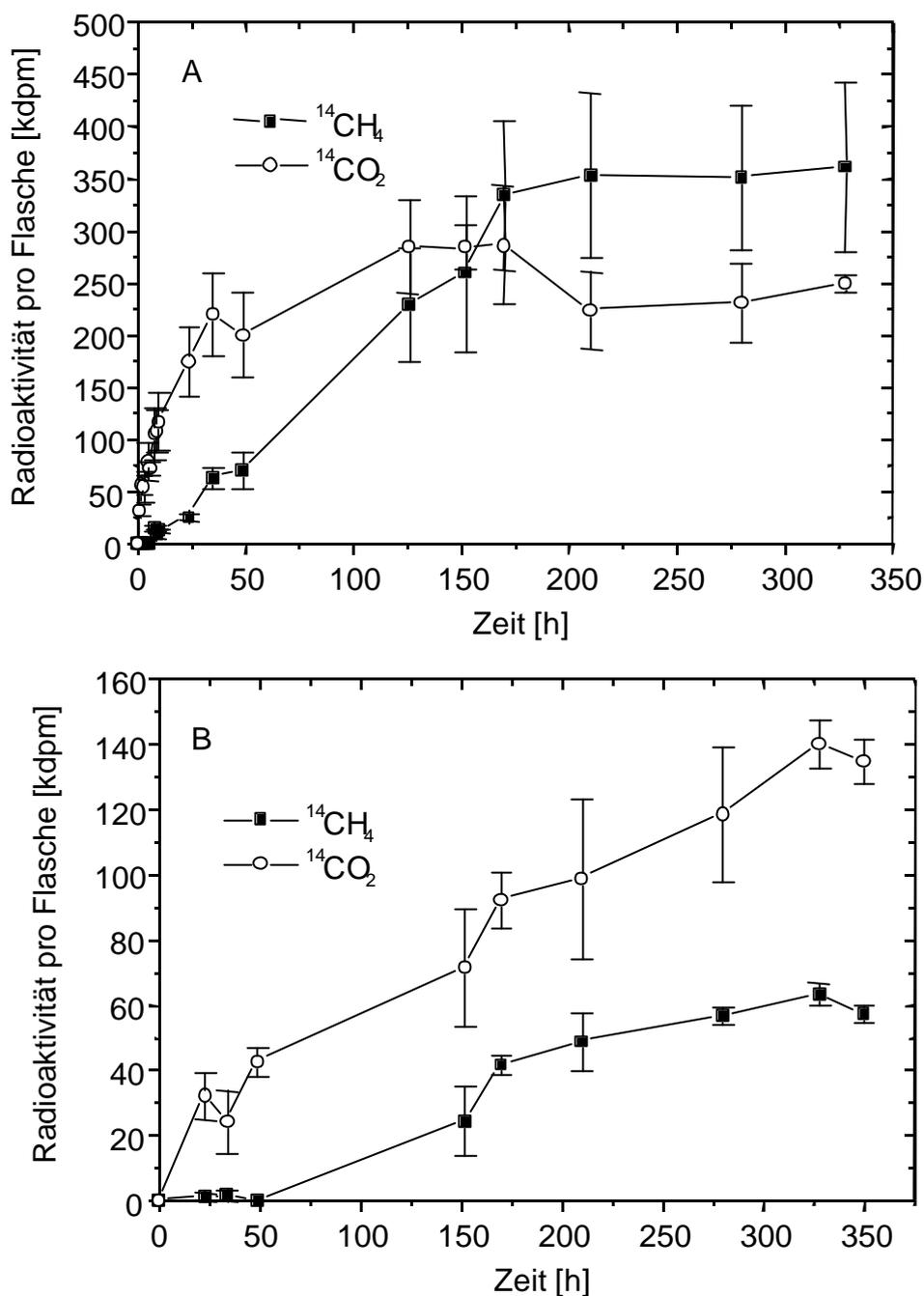


Abbildung 4: Umsatz von $[^{14}\text{C}]$ Methanol zu $^{14}\text{CH}_4$ und $^{14}\text{CO}_2$ im Profundalsediment des Plußsees vom 03.11.1999 bei 25°C (A) und 4°C (B). Daten zeigen Mittelwerte von 3 parallelen Ansätzen \pm Standardfehler

Wie man in der Abbildung 4 A und B sieht, wurde das zugegebene $[^{14}\text{C}]$ Methanol zu $^{14}\text{CH}_4$ und $^{14}\text{CO}_2$ bei 25°C und 4°C umgesetzt. Die Umsatzzeit war mit 95,8 h bei 25°C bzw. 153 h bei 4°C deutlich größer als die Umsatzzeiten von Acetat (s. Anhang: Tabelle 6). Da die genaue Methanolkonzentration im Porenwasser der Profundalsedimente des Plußsees nur mit $<50 \text{ nmol cm}^{-3}$ bestimmt werden konnte, da die Detektionsgrenze bei $50 \mu\text{M}$ lag, waren

die Umsatzrate V_{meth} und die Methanolabhängige CH_4 -Produktionsrate P_{meth} Annäherungen. Die Ergebnisse zeigen aber auch hier, dass die methanolabhängige CH_4 -Produktion nur einen Bruchteil der Gesamtmethanproduktion ausmachte.

Die Isotopensignatur von CH_4 und CO_2 im Plußsee wurde in Sedimentaufschlammungen mit Profundalsediment vom November 1998 und mit Wasserproben vom November 1998 durchgeführt. Wurden die Sedimentaufschlammungen bei 25°C inkubiert, dann waren die $\delta^{13}\text{CH}_4$ -Werte negativer als bei einer Inkubation bei 4°C (s. Anhang: Tabelle 5). Das gleiche wurde bei den $\delta^{13}\text{CO}_2$ -Werten beobachtet, was sich dann auch mit einem höheren α_c -Wert bei 25°C im Vergleich zu 4°C zeigte. Die Gasprobe aus der Wasserschicht direkt über dem Sediment ergab, dass sowohl $\delta^{13}\text{CH}_4$ als auch $\delta^{13}\text{CO}_2$ negativer waren, als es in den Sedimentaufschlammungen der Fall war. Bei der Analyse des $\delta^{13}\text{C}_{\text{org}}$ des Sedimentes erhielt man einen Wert von $-30,11\text{‰}$.

In Experimenten, die zur Stimulierung der Methanbildung dienten, wurden 10 mM Glucose (Endkonzentration) und 10 mg cm^{-3} Sedimentaufschlammung Pectin in vorbereitete Sedimentaufschlammungen dazugegeben. Der Abbau dieser Substrate wurde dann durch Gas- und Porenwasseranalysen dokumentiert. Glucose wurde sowohl bei 25°C (s. Anhang: Abbildung 8 A), als auch bei 4°C (s. Anhang: Abbildung 8 B) unter H_2 -Bildung zu Acetat und Butyrat fermentiert. Bei 4°C wurden zusätzlich noch Formiat und Laktat akkumuliert. Die CO_2 -Produktion wurde bei beiden Temperaturen stimuliert (Daten nicht gezeigt). Eine zum Schluss durchgeführte Massen- und Elektronenbilanz ergab, dass 70% und 100% des zugegebenen Kohlenstoffes und 75% und 68% der verfügbaren Elektronen bei 25°C bzw. 4°C wiedergefunden worden sind. Pectin stimulierte im Gegensatz zu Glucose die CH_4 -Produktion in den Sedimentaufschlammungen bei 25°C (s. Anhang: Abbildung 9 A). Acetat wurde als das wichtigste Fermentationsprodukt bei 25°C und 4°C akkumuliert (s. Anhang: Abbildung 9 A und 9 B). In geringerem Maße wurden auch Propionat, Butyrat und Formiat angereichert. In der Massenbilanz wurden von dem zugegebenem Pectin (unter der Annahme des Molekulargewichtes von β -Galakturonsäure) 75% und 66% des zugegebenen Kohlenstoffes und 89% und 63% der verfügbaren Elektronen bei 25°C bzw. 4°C wiedergefunden.

Auf die Zugabe von Acetat, Methanol, Formiat und Wasserstoff und die Bestimmung der Isotopensignatur wird im Kapitel 3.2.5 eingegangen.

3.2 Lake Kinneret: Untersuchungen zur Methanbildung

3.2.1 Methanproduktion im Lake Kinneret: Temperaturabhängigkeit und Lokalisation der Methanbildung, Charakterisierung der chemischen Parameter

Für die folgenden Untersuchungen zur Methanbildung im Lake Kinneret mussten zuerst die zwei Temperaturen festgelegt werden, bei denen die Inkubationen durchgeführt werden sollten. Da die im Profundal vorherrschende Temperatur 15-17°C beträgt, sollte die tiefere der beiden Temperaturen in diesem Bereich liegen. Zur Überprüfung, inwieweit sich noch eine tiefere Inkubationstemperatur auf die CH₄-Produktion auswirkt, wurde ein Ansatz von Sedimentaufschlämmungen bei 10°C inkubiert. Die weiteren zu testenden Inkubationstemperaturen waren 15°C, 25°C und 30°C.

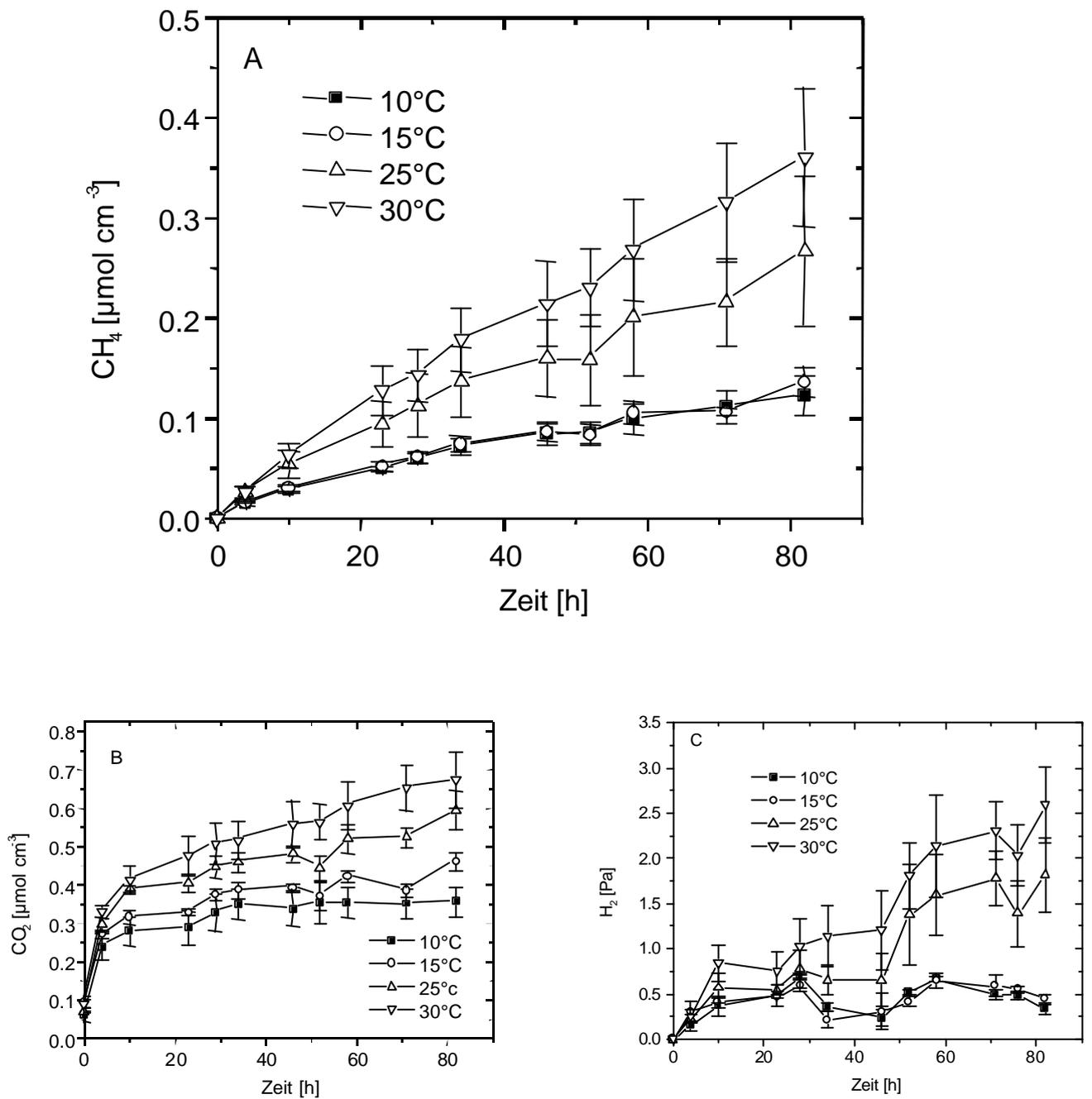


Abbildung 5: CH₄-Produktion (A), CO₂-Konzentrationen (B) [$\mu\text{mol cm}^{-3}$] und H₂-Konzentrationen (C) [Pa] bei 10°C, 15°C, 25°C und 30°C in Sedimentaufschlammungen von Profundalsediment aus 0 - 15 cm Tiefe vom 03.08.1998. Daten zeigen Mittelwerte von 3 parallelen Ansätzen \pm Standardfehler

Wie man in Abbildung 5 A sieht, war zwischen den Inkubationen bei 10°C und 15°C nahezu kein Unterschied in der Methanproduktion festzustellen. Eine deutlich stärkere Methanproduktion war aber bei den Ansätzen, die bei 30°C inkubiert worden waren, im Vergleich zu denen, die bei 25°C inkubiert worden waren, festzustellen. Aufgrund dieser Ergebnisse wurden die weiteren Versuche bei 15°C und 30°C durchgeführt.

Um einen möglichen saisonalen Einfluss auf die Methanproduktion zu dokumentieren, wurden zu verschiedenen Zeitpunkten Sedimentproben entnommen und diese dann auf ihr Methanproduktionspotential hin untersucht. Im folgenden sind die Methanproduktionsraten der verschiedenen Probenzeitpunkten tabellarisch dargestellt:

Tabelle 3: CH₄-Produktionsraten [nmol h⁻¹ cm⁻³] von Profundalsediment aus 0 - 15 cm Tiefe bei 15°C und 30°C in Abhängigkeit des Probenahmezeitpunktes. Daten zeigen Mittelwerte von 3 parallelen Ansätzen ± Standardfehler:

Tag der Probennahme	CH ₄ -Produktionsraten [nmol h ⁻¹ cm ⁻³]	
	Inkubation bei 30°C	Inkubation bei 15°C
03.08.1998	2,14 ± 0,05	0,75 ± 0,03
27.05.1999	2,06 ± 0,11	0,12 ± 0,01
06.06.1999	1,68 ± 0,06	0,11 ± 0,01
13.06.1999	2,76 ± 0,14	0,51 ± 0,03
16.06.1999	2,76 ± 0,06	0,51 ± 0,02
03.08.1999	2,70 ± 0,77	0,77 ± 0,08

Die Methanproduktionsraten lassen bei einer Inkubationstemperatur von 30°C und 15°C keinen großen saisonalen Einfluss erkennen. 1999 nahm die Methanproduktion während des beobachteten Zeitraumes zu. Wurde bei 15°C inkubiert, waren die CH₄-Produktionsraten um 75 % bis 80 % niedriger als bei 30°C.

Zusätzlich zu den CH₄-Konzentrationen wurden während den Inkubationen auch die CO₂- und die H₂-Konzentrationen bestimmt. Als Beispiel sollen hierbei die Daten, die bei den oben beschriebenen Inkubationen bei 10°C, 15°C, 25°C und 30°C erhalten wurden, gezeigt werden.

Man sieht, dass sich nach spätestens 10 h sich die CO₂-Konzentrationen zwischen der Gasphase und der flüssigen Phase equilibriert haben (Abbildung 5 B). Während nun aber

bei den niedrigeren Temperaturen nahezu keine Zunahme festzustellen war, kam es bei den Inkubationen bei 25°C und 30°C noch zu einer weiteren CO₂-Produktion. Diese Daten stimmten mit später erhobenen Daten überein. Ein ähnliches Bild zeigen die H₂-Konzentrationen in Abhängigkeit von der Inkubationszeit und Inkubationstemperatur (Abbildung 5 C). Während sich bei den niedrigen Inkubationstemperaturen eine H₂-Konzentration um 0,5 Pa einstellte und nahezu konstant blieb, kam es bei den höheren Inkubationstemperaturen zu einer Zunahme der Konzentrationen bis zu 3 Pa. In späteren Experimenten wurde beobachtet, dass nach einer Inkubationszeit von 100 h die H₂-Konzentrationen wieder abnahmen und sich auf einen Wert unter 1 Pa einstellten (Daten nicht gezeigt).

Bei der Analyse des Porenwassers auf die vorhandenen Fettsäuren wurde als einziges Acetat detektiert. Die Konzentration lag zwischen 12,5 und 27,5 nmol cm⁻³ Sediment. Die Porenwasserproben, die bei den verschiedenen Probenahmezeitpunkten genommen wurden, zeigten keine großen Unterschiede in ihren Acetat-Konzentrationen zueinander.

Die Bestimmung des Bicarbonatgehaltes erbrachte einen Wert von $30,8 \pm 5,2$ mM.

Aufgrund des hohen Carbonatgehaltes ist das Sediment sehr gut gegen pH-Schwankungen gepuffert. Der pH-Wert lag bei allen durchgeführten Versuchen zwischen 7,5 und 7,8.

Zur Lokalisation der Methanbildung im Profundalsediment wurden, wie in 2.2 und 2.3 beschrieben, Kerne aus dem Profundalsediment in einzelne Schichten geschnitten. Bei den Inkubationen der Sedimentaufschlämmungen der einzelnen Schichten bei 30°C und 15°C ergab sich eine deutliche Abhängigkeit der Methanproduktion von der Tiefe im Sediment.

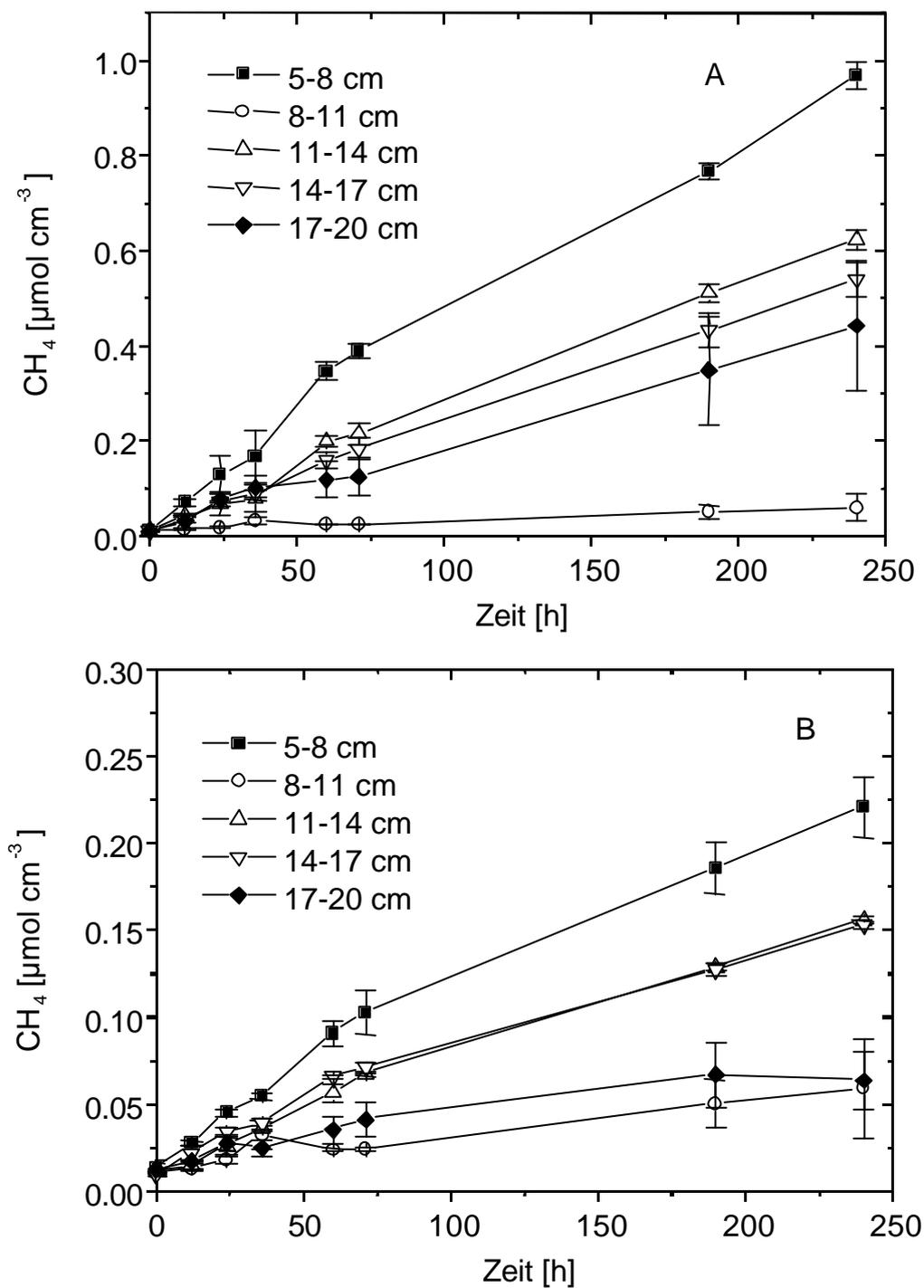


Abbildung 7: CH_4 -Produktion [$\mu\text{mol cm}^{-3}$] in den Schichten 620 cm des Profundsediments vom 10.06.1999, gemessen in Sedimentaufschlämmungen die bei 30°C (A) bzw. 15°C (B) inkubiert wurden. Daten zeigen Mittelwerte von 3 parallelen Ansätzen \pm Standardfehler

Tabelle 4: CH₄-Produktionsraten [nmol h⁻¹ cm⁻³] der Schichten 0-20 cm im Profundalsediment vom 10.6.1999, gemessen in Sedimentaufschlämmungen die bei 30°C bzw. 15°C inkubiert wurden. Daten zeigen Mittelwerte von 3 parallelen Ansätzen ± Standardfehler:

Schichttiefe	CH ₄ -Produktionsraten [nmol h ⁻¹ cm ⁻³]	
	30°C	15°C
0 - 1 cm	27,6 ± 1,5	6,6 ± 0,4
1 - 2 cm	17,91 ± 1,5	3,8 ± 0,3
2 - 3 cm	10,3 ± 0,6	2,8 ± 0,4
3 - 4 cm	8,2 ± 0,6	1,9 ± 1,3
4 - 5 cm	7,3 ± 0,4	1,9 ± 0,1
5 - 8 cm	3,9 ± 0,2	0,8 ± 0,1
8 - 11 cm	0,2 ± 0,0	0,2 ± 0,0
11 - 14 cm	2,6 ± 0,1	0,6 ± 0,1
14 - 17 cm	2,2 ± 0,0	0,6 ± 0,0
17 - 20 cm	1,7 ± 0,1	0,2 ± 0,0

Man sieht in Tabelle 4, dass die CH₄-Produktionsraten in der obersten Schicht um bis zu 10-fach höher waren als in den unteren Schichten.

Wie bei den CH₄-Konzentrationen war auch bei den CO₂-Konzentrationen und den H₂-Konzentrationen eine Korrelation mit der Schichttiefe zu beobachten. Die Konzentrationen nahmen mit der Tiefe im Sediment ab (Daten nicht gezeigt).

Vergleichend zu den CH₄-Produktionsraten im Profundalsediment wurden auch die Sedimente aus der Übergangszone zwischen dem Profundal und dem Littoral (Station F) und dem Uferbereich (Station S) auf ihre Methanbildung untersucht.

Tabelle 5: CH₄-Produktionsraten [nmol h⁻¹ cm⁻³] der Sedimente von Station F und S vom 13.06.1999 aus 0 - 15 cm Tiefe, gemessen in Sedimentaufschlämmungen die bei 30°C bzw. 15°C inkubiert wurden. Daten zeigen Mittelwerte von 3 parallelen Ansätzen ± Standardfehler:

Station	CH ₄ -Produktionsraten [nmol h ⁻¹ cm ⁻³]	
	30°C	15°C
F	0,96 ± 0,03	0,36 ± 0,02
S	2,49 ± 0,12	1,42 ± 0,06

Wie auch im Profundalsediment war die Methanproduktion im Sediment der Stationen F und S temperaturabhängig. Auffallend hierbei aber war, dass der Unterschied in den CH₄-Produktionsraten zwischen 30°C und 15°C geringer war, als es im Profundalsediment beobachtet wurde. Eine höhere Inkubationstemperatur von 30°C führte zu einer Verdopplung der CH₄-Produktionsraten. Ebenso ist ein deutlicher Unterschied zwischen den drei Stationen zu beobachten. Während Station A mit Station S eine sehr ähnliche CH₄-Produktionsrate (Tabelle 3 und 5), wurde bei Station F nur ca. die Hälfte der CH₄ im Vergleich zu den anderen zwei Standorten produziert. Anzumerken ist außerdem, dass bei einer Inkubation bei 15°C die CH₄-Produktionsrate bei Station S doppelt so hoch war wie bei Station A (Tabellen 3 und 5).

Für eine Differenzierung zwischen den verschiedenen Stoffwechselwegen, die zur CH₄-Bildung führen, wurden thermodynamische Berechnungen mit der Bestimmung der Differenzen der freien Energie (ΔG) unter *in situ* Bedingungen durchgeführt. Dafür wurden die in 2.9.6 beschriebenen Reaktionen (Tabelle 1 und 2) verwendet. Die Konzentrationen der beteiligten Substrate und Produkte wurden aus den Inkubationen vom 28.6.99 und 29.6.99 (Abbildung 8 A und B) in die Reaktionsgleichungen eingesetzt.

Tabelle 6: ΔG -Werte (kJ / mol Reaktion) der homoacetogenen und methanogenen Reaktionen unter *in situ* Bedingungen bei 15°C (ΔG_{15}) und 30°C (ΔG_{30}) in Sedimentaufschlammungen aus dem Profundalsediment vom Lake Kinneret aus 1 - 15 cm Tiefe. Daten zeigen Mittelwerte von 3 parallelen Ansätzen \pm Standardfehler

Reaktion	ΔG_{15} (kJ/ mol)	ΔG_{30} (kJ/ mol)
(1) $4 \text{ H}_2 + 2 \text{ CO}_2 \Rightarrow \text{CH}_3\text{COO}^- + \text{H}^+ + 2 \text{ H}_2\text{O}$	$52,9 \pm 1,3$	$67,3 \pm 1,8$
(2) $4 \text{ H}_2 + \text{ CO}_2 \Rightarrow \text{CH}_4 + 2 \text{ H}_2\text{O}$	$-26,3 \pm 1,4$	$-13,8 \pm 1,7$
(3) $\text{CH}_3\text{COO}^- + \text{H}^+ \Rightarrow \text{CH}_4 + \text{ CO}_2$	$-80,9 \pm 1,3$	$-86,3 \pm 1,6$
(4) $\text{CH}_3\text{COO}^- + \text{H}^+ + 2 \text{ H}_2\text{O} \Rightarrow 4 \text{ H}_2 + 2 \text{ CO}_2$	$-52,9 \pm 1,3$	$-67,3 \pm 1,8$

Die ΔG_{30} -Werte stammen aus Inkubationen vom 28.06.1999 mit Sediment vom 16.06.99 und sind gemittelt aus den Daten im Zeitabstand 0 - 86 h der Inkubation (Abbildung 8 A).

Die ΔG_{15} -Werte stammen aus Inkubationen vom 29.06.1999 mit Sediment vom 16.06.99 und sind gemittelt aus den Daten im Zeitabstand 0 - 312 h der Inkubation (Abbildung 8 B).

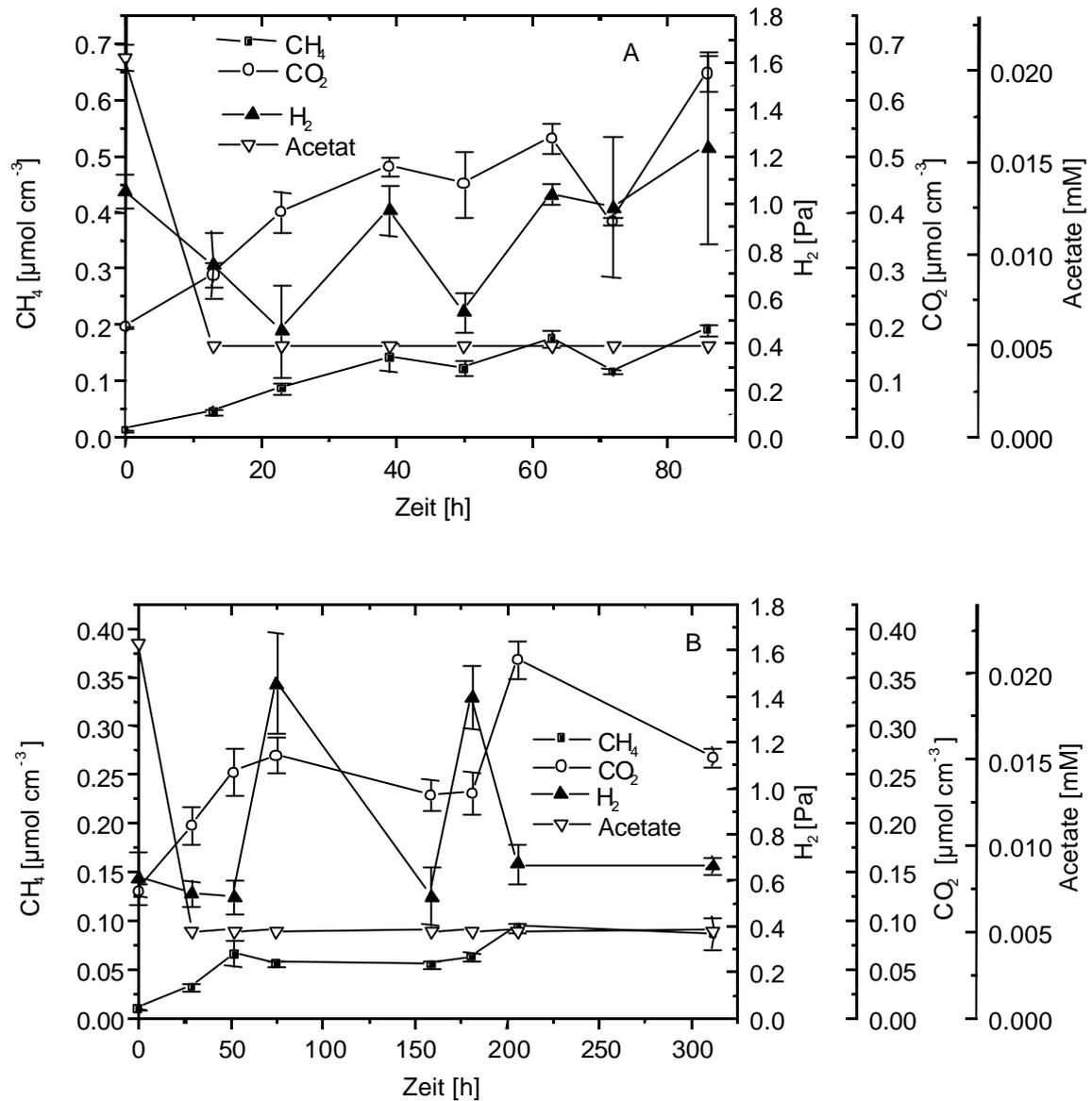


Abbildung 8: CH_4 -Konzentrationen [$\mu\text{mol cm}^{-3}$], CO_2 -Konzentrationen [$\mu\text{mol cm}^{-3}$], H_2 -Konzentrationen [Pa] und Acetat-Konzentrationen [mM] mit Profundalsediment vom 16.6.99 gemessen in Sedimentaufschlämungen bei 30°C (A) bzw. 15°C (B). Daten zeigen Mittelwerte von 3 parallelen Ansätzen \pm Standardfehler

3.2.2 Hemmung der Methanbildung im Profundalsediment vom Lake Kinneret

Bei der Charakterisierung des Sedimentes wurde festgestellt, dass Acetat die einzige detektierbare Fettsäure war. Durch Hemmversuche wurde nun überprüft, inwieweit Acetat in der Methanbildung involviert war. Um die einzelnen Anteile der hydrogenotrophen und der acetoklastischen Methanogenese an der gesamten Methanbildung im Profundalsediment zu bestimmen, wurden verschiedene Hemmstoffe eingesetzt.

Als ein spezifischer Hemmstoff für die Methanogenen wurde BES verwendet. Da in Vorversuchen ein Hemmung mit 10 und 20 mM BES (Endkonzentration) zu keiner oder zu einer sehr schwachen Hemmung der Methanogenen bei 30°C geführt hat, wurde eine Konzentration von 25 mM BES eingesetzt.

Bei den Ansätzen, die bei 30°C inkubiert wurden, wurde die CH₄-Produktion gehemmt. Diese Hemmung war nicht vollständig, so dass immer noch etwas CH₄ produziert wurde (Abbildung 9 A).

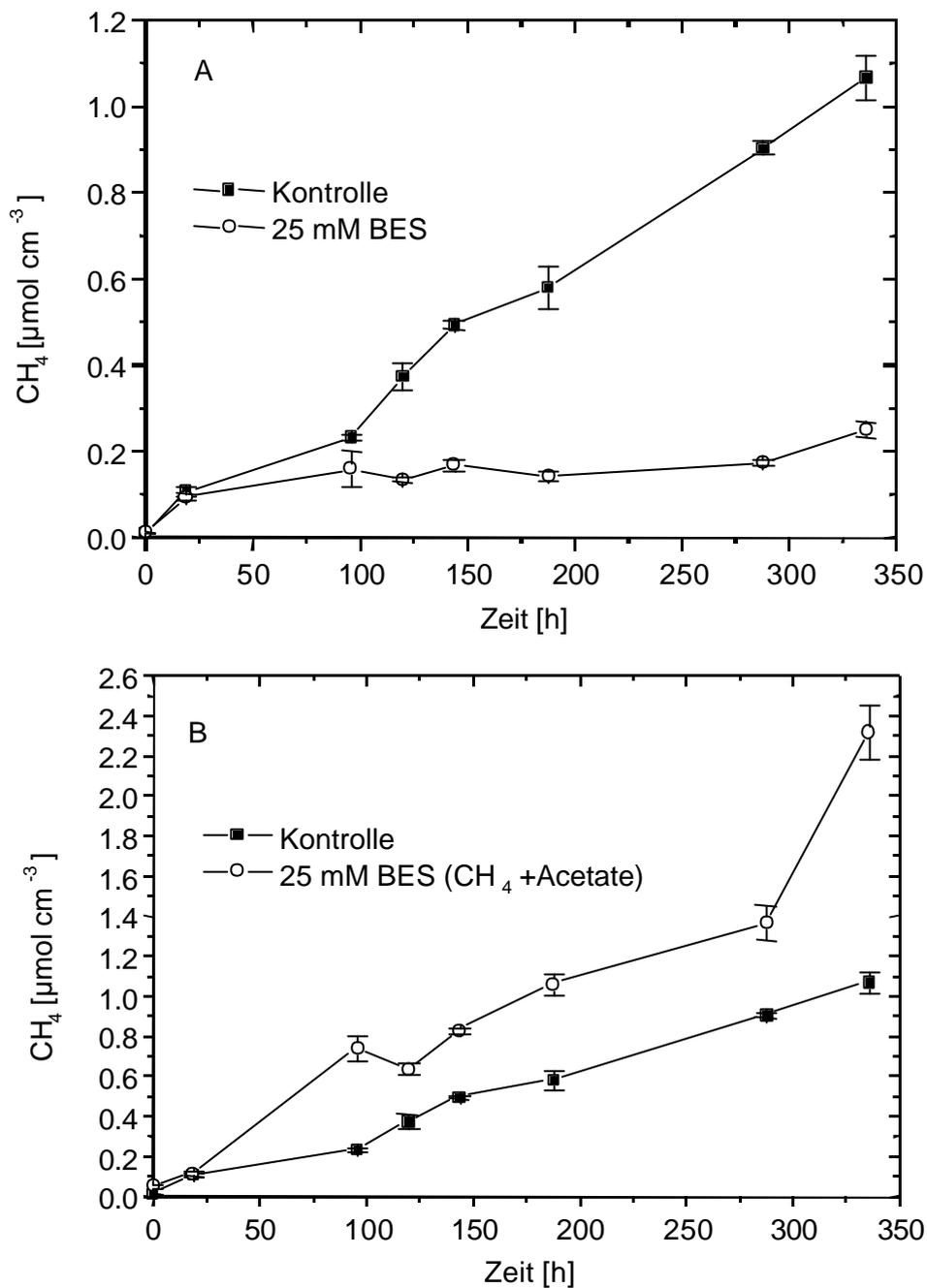


Abbildung 9: Inhibition der Methanogenese mit 25 mM BES. CH₄-Produktion [μmol cm⁻³] der Kontrollansätze und der gehemmten Ansätze, gemessen in Sedimentaufschlämmungen bei 30°C (A). Akkumulierte Menge CH₄ im Kontrollansatz [μmol cm⁻³] und äquivalente Menge CH₄ berechnet aus dem akkumulierten Acetat der mit BES gehemmten Ansätze (B). Es wurde Profundalsediment vom 16.06.1999 aus 0 - 15 cm Tiefe verwendet. Daten zeigen Mittelwerte von 3 parallelen Ansätzen ± Standardfehler

In den gehemmten Ansätzen wurde Acetat akkumuliert. Eine Akkumulation von H_2 wurde während des Versuches nicht festgestellt. Zur Bilanzierung des Verhältnisses von akkumuliertem Acetat im gehemmten Ansatz zu gebildetem Methan im Kontrollansatz wurde das akkumulierte Acetat in die äquivalente Menge Methan umgerechnet. Hierbei wurde zusätzlich die in den gehemmten Ansätzen gebildete Menge an Methan mit in die Bilanzierung einbezogen. Es wurde mehr Acetat akkumuliert, als es durch die Methanbildung benötigt worden wäre (Abbildung 9 B).

Die Zugabe von 25 mM BES und eine anschließende Inkubation bei 15°C resultierte in einer sehr schwachen bis gar keiner Hemmung der Methanbildung. Es wurde keine Akkumulation von Acetat beobachtet. Dieser Befund wurde durch mehrmaliges Durchführen des Experimentes bestätigt.

Methylfluorid (CH_3F) wurde als Hemmstoff zur Differenzierung zwischen der hydrogenotrophen und der acetoklastischen Methanogenese eingesetzt. In Vorversuchen, die zur Bestimmung der optimalen Hemm-Konzentration von CH_3F dienten, wurde herausgefunden, dass bei zugegebenen Konzentrationen zwischen 1,0 und 3,0 % CH_3F noch acetoklastische Methanogenese stattfand. Dies wurde durch Zugabe von [2- ^{14}C]-Acetat und dessen Umsatz zu $^{14}CH_4$ und $^{14}CO_2$ herausgefunden. Bei einer Zugabe von 3,5 % CH_3F war hingegen die acetoklastische Methanogenese völlig gehemmt.

Wurden die Ansätze bei 30°C inkubiert, so kam es zu einer nahezu vollständigen Hemmung der Methanbildung (Abbildung 10 A).

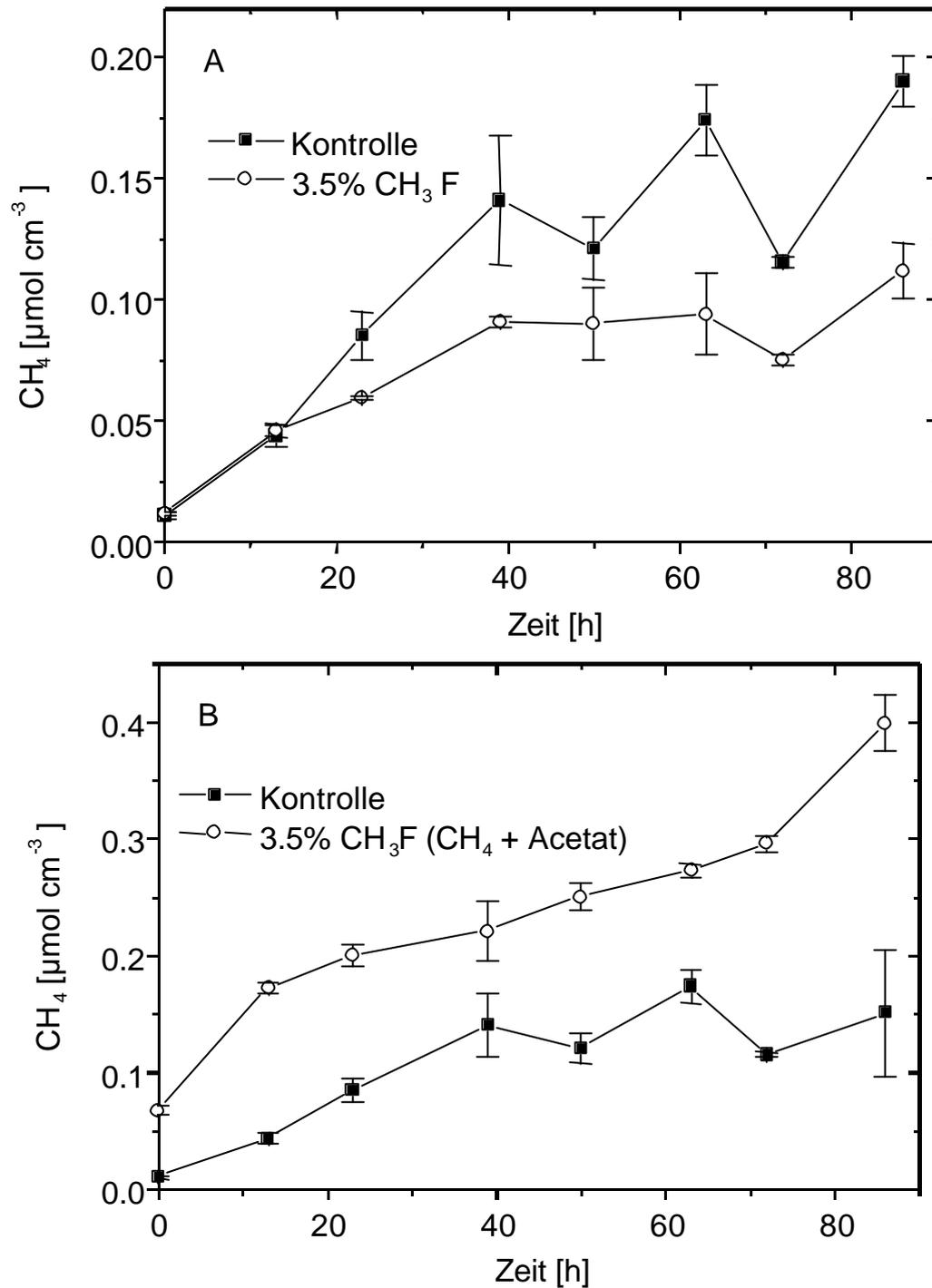


Abbildung 10: CH₄-Produktion [$\mu\text{mol cm}^{-3}$] nach der Zugabe von 3,5% CH₃F in den gehemmten Ansätzen und in den Kontrollansätzen, gemessen in Sedimentaufschlämungen die bei 30°C (A) inkubiert wurden. Akkumulierte Menge CH₄ im Kontrollansatz [$\mu\text{mol cm}^{-3}$] und äquivalente Menge CH₄, berechnet aus dem akkumulierten Acetat der mit CH₃F gehemmten Ansätze (B). Es wurde Profundalsediment aus 0 - 15 cm Tiefe vom 16.06.1999 verwendet. Daten zeigen Mittelwerte von 3 parallelen Ansätzen \pm Standardfehler

In den gehemmten Ansätzen wurde im Porenwasser Acetat akkumuliert. Eine Akkumulation von H_2 wurde nicht beobachtet. In der Bilanzierung wurde jedoch mehr Acetat, als equivalent CH_4 in den Kontrollansätzen produziert wurde, akkumuliert und zwar am Ende der Inkubation bis zu 300 % zuviel (Abbildung 10 B). Zu beachten ist hierbei, dass auch CH_4 in den gehemmten Ansätzen von den hydrogenotrophen Methanogenen produziert wurde.

Wurde CH_3F als Hemmstoff in Ansätze, die bei $15^\circ C$ inkubiert wurden, dazugegeben, dann wurde die Methanproduktion zu $24 \pm 8 \%$ gehemmt (Abbildung 11).

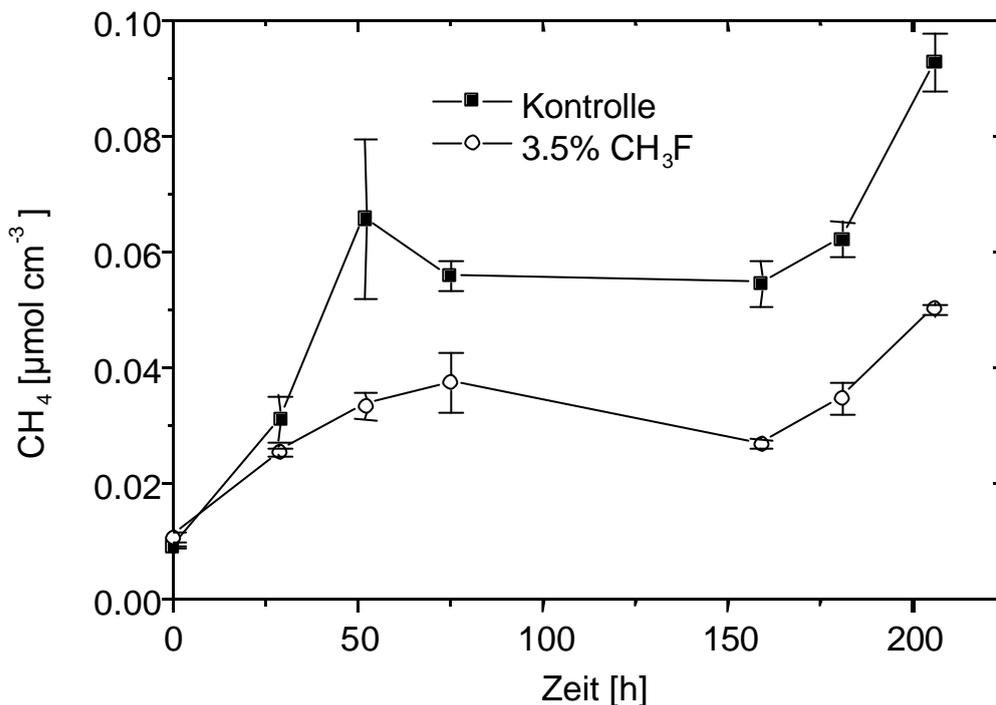


Abbildung 11: CH_4 -Produktion [$\mu mol cm^{-3}$] nach der Zugabe von 3,5% CH_3F in den gehemmten Ansätzen und in den Kontrollansätzen, gemessen in Sedimentaufschlämmungen die bei $15^\circ C$ inkubiert wurden. Es wurde Profundalsediment aus 0 - 15 cm Tiefe vom 16.06.1999 verwendet. Daten zeigen Mittelwerte von 3 parallelen Ansätzen \pm Standardfehler

Trotz der leichten Hemmung der Methanbildung kam es nicht zu einer Akkumulation von Acetat, wie es bei den Ansätzen bei $30^\circ C$ beobachtet wurde. Somit konnte auch keine Bilanzierung durchgeführt werden.

Chloroform wurde als ein weiterer Hemmstoff der Methanogenen verwendet. Die Zugabe von $100 \mu M CHCl_3$ (Endkonzentration) bei $30^\circ C$ resultierte in einer vollständigen Hemmung der Methanbildung (Abbildung 12 A). Acetat und Wasserstoff akkumulierten. Bei der Bilanzierung wurde deshalb auch Wasserstoff in die Bilanz mit einbezogen.

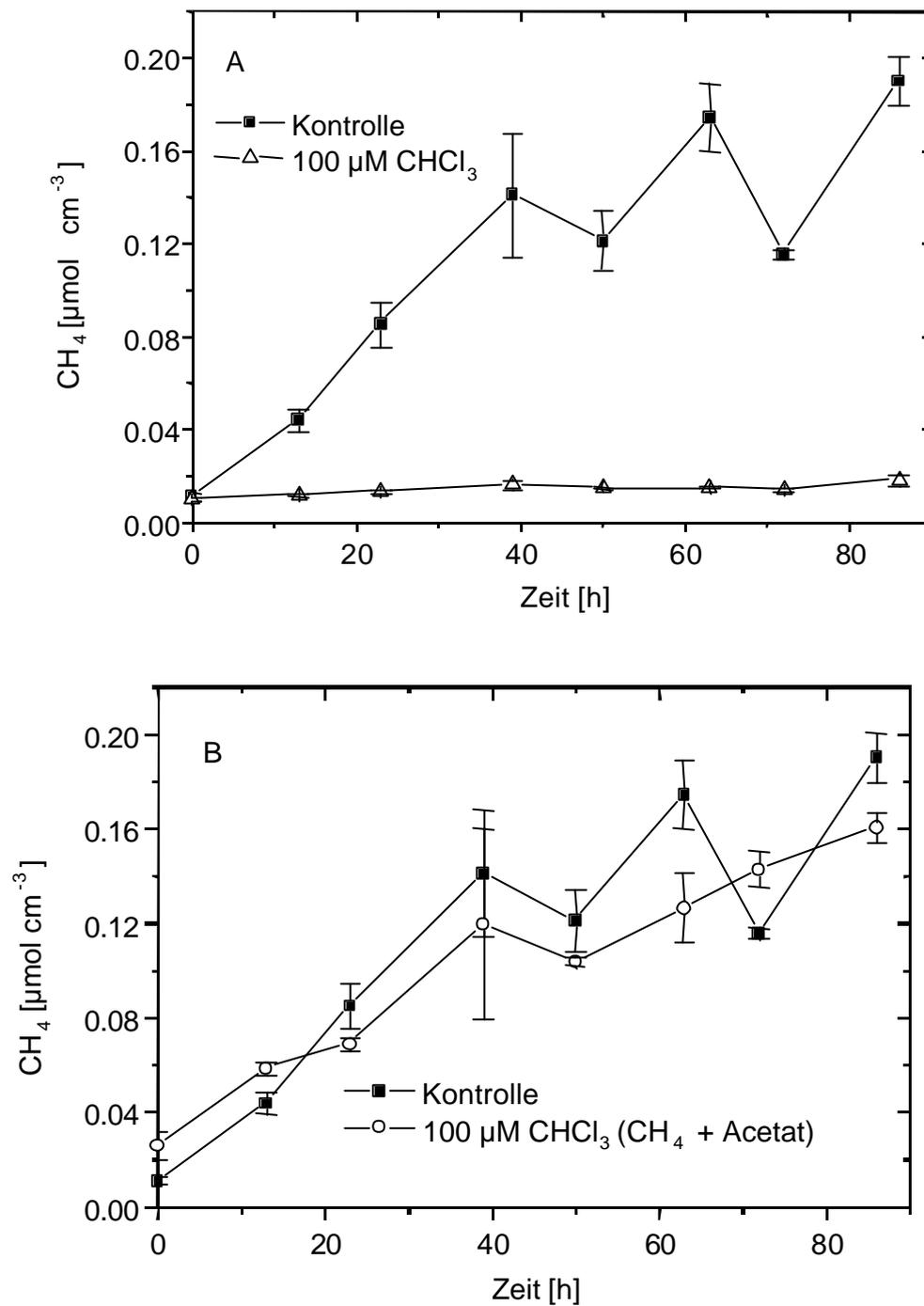


Abbildung 12: CH_4 -Produktion [$\mu\text{mol cm}^{-3}$] nach der Zugabe von 100 μM CHCl_3 in den gehemmten Ansätzen und in den Kontrollansätzen, gemessen in Sedimentaufschlämmungen die bei 30°C (A) inkubiert wurden. Akkumulierte Menge CH_4 im Kontrollansatz [$\mu\text{mol cm}^{-3}$] und äquivalente Menge CH_4 berechnet aus dem akkumulierten Acetat der mit CHCl_3 gehemmten Ansätze (B). Es wurde Profundensediment aus 0 - 15 cm Tiefe vom 16.06.1999 verwendet. Daten zeigen Mittelwerte von 3 parallelen Ansätzen \pm Standardfehler

Die Bilanz (Abbildung 12 B) zeigt, dass im Durchschnitt weniger Acetat und Wasserstoff akkumuliert wurde, als Methan in den Kontrollansätzen produziert wurde.

Da bei 15°C weder BES noch CH_3F eine entsprechende Hemmung der Methanogenen verursachten, blieb als Hemmstoff nur noch Chloroform (CHCl_3) übrig. Um zu testen, ob BES auch in Kombination mit CHCl_3 zu einer Hemmung der Methanbildung führt, wurde in einen Ansatz 25 mM BES und 100 μM CHCl_3 (Endkonzentration) injiziert. Chloroform wurde zusätzlich alleine in einer Konzentration von 200 μM in einen separaten Ansatz als Hemmstoff eingesetzt. Als Gegenkontrolle wurde auch ein Ansatz mit 25 mM BES hergestellt. Wie bei den früher bei 15°C durchgeführten Hemmversuchen mit BES als Hemmstoff kam es auch hier zu einer schwachen Hemmung der Methanbildung nach der BES-Zugabe (Abbildung 13 A). In der Kombination BES + CHCl_3 kam es zu einer deutlichen Hemmung wie auch bei der alleinigen Verwendung von CHCl_3 . Acetat wurde nur in den Ansätzen mit BES + CHCl_3 oder CHCl_3 akkumuliert. Da bei der Hemmung mit BES kein Acetat akkumuliert wurde, wurde dieser Ansatz nicht in die Bilanz mit einbezogen.

Die Bilanz stimmte bei 15°C nicht zu 100% überein, da die Menge an akkumuliertem Acetat nicht äquivalent zu der Menge an akkumuliertem CH_4 in den Kontrollansätzen war.

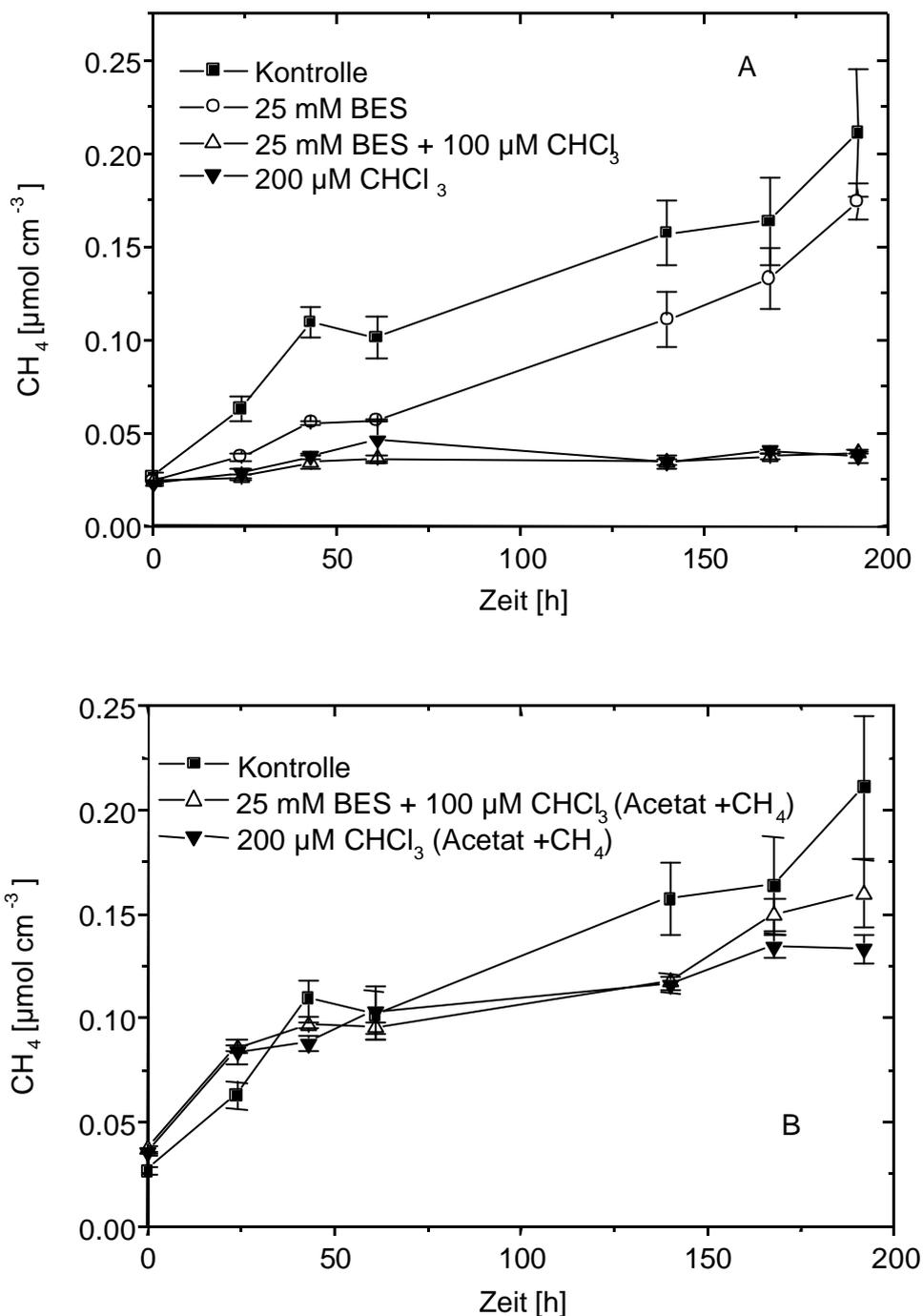


Abbildung 13: CH_4 -Produktion [$\mu\text{mol cm}^{-3}$] nach der Zugabe von 25 mM BES, 25 mM BES + 100 μM CHCl_3 oder 200 μM CHCl_3 in den gehemmten Ansätzen und in den Kontrollansätzen (A), gemessen in Sedimentaufschlämungen die bei 15°C inkubiert wurden. Akkumulierte Menge CH_4 im Kontrollansatz [$\mu\text{mol cm}^{-3}$] und äquivalente Menge CH_4 berechnet aus dem akkumulierten Acetat der mit BES + CHCl_3 oder nur mit CHCl_3 gehemmten Ansätze (B). Versuche wurden mit Profundalsediment aus 0 - 3 cm Tiefe vom 03.08.1999 durchgeführt. Daten zeigen Mittelwerte von 3 parallelen Ansätzen \pm Standardfehler

3.2.3 Bestimmung des Acetatumsatzes im Sediment von Lake Kinneret

Die Versuche, bei denen $[2-^{14}\text{C}]$ Acetat zugegeben wurde, zeigten, dass der Umsatz von Acetat im Profundalsediment sowohl bei 30°C als auch bei 15°C sehr schnell erfolgte. So lag die Turnover Zeit bei 30°C zwischen 10 und 30 min und bei 15°C zwischen 13 und 70 min. Ein Beispiel für diesen schnellen Umsatz ist in den Abbildungen 14 A und B gezeigt, die den Umsatz von $[2-^{14}\text{C}]$ Acetat im Profundalsediment aus der Schichttiefe 2-3 cm bei der Inkubation von 30°C bzw. 15°C zeigen.

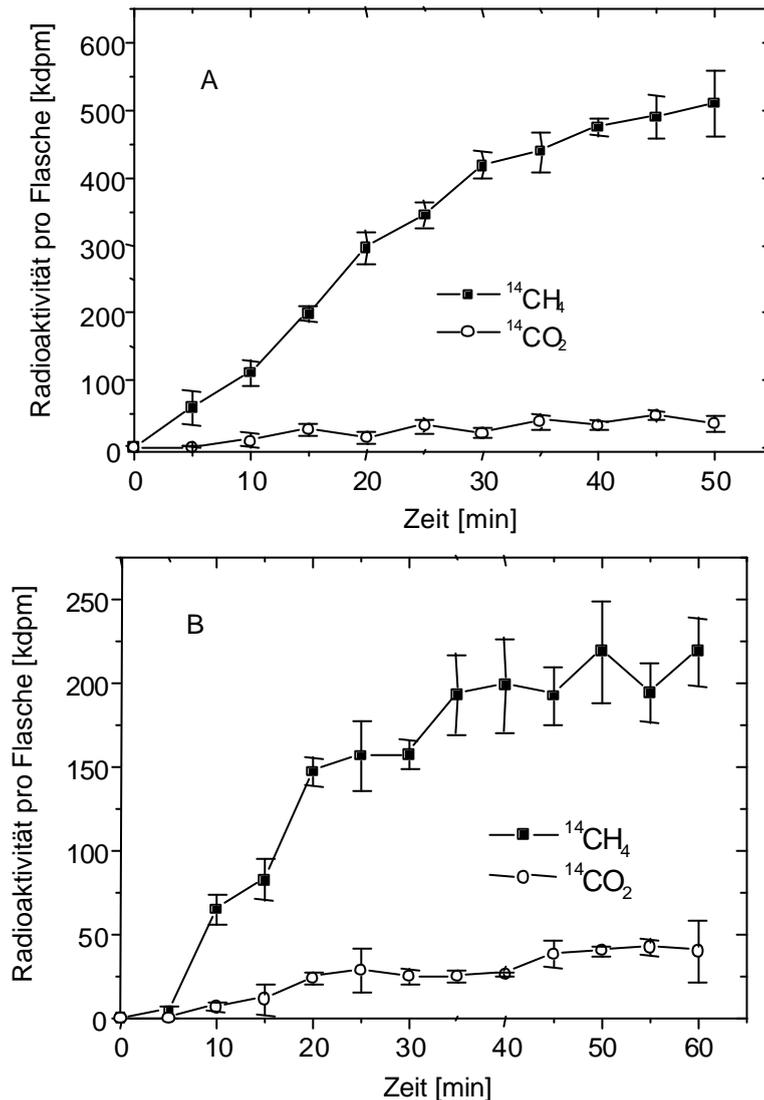


Abbildung 14: Umsatz von $[2-^{14}\text{C}]$ Acetat zu $^{14}\text{CH}_4$ und $^{14}\text{CO}_2$ [kdpm] bei 30°C (A) und 15°C (B) in der Schicht 2-3 cm des Profundalsedimentes vom 16.6.1999. Daten zeigen Mittelwerte von 3 parallelen Ansätzen \pm Standardfehler

Für eine differenzierte Betrachtung des Acetatumsatzes wurden die in den Experimenten erhaltenen Daten mittels der in 2.9.4 aufgeführten Gleichungen umgerechnet.

Tabelle 7.1: Umsatz von [2-¹⁴C]Acetat und Methanogenese in Sedimentaufschlammungen des Profundalsedimentes aus Lake Kinneret vom 10.6.1999 in einer Tiefe von 1 - 5 cm bei einer Inkubationstemperatur von 30°C. Daten zeigen Mittelwerte von 3 parallelen Ansätzen ± Standardfehler

Parameter	1 cm	2 cm	3 cm	4 cm	5 cm
Maximaler Anteil des aus dem zugegebenen [2-¹⁴C]Acetat gebildeten ¹⁴CH₄ und ¹⁴CO₂	0,15 ± 0,07	0,28 ± 0,02	0,24 ± 0,01	0,22 ± 0,01	0,23 ± 0,01
T_t Acetat-Umsatz-Zeit [min]	29,2 ± 4,3	18,9 ± 1,3	12,9 ± 0,5	16,4 ± 2,5	10,0 ± 0,2
C_{ac} Acetat-Konzentration [nmol cm⁻³]	55	50	43	37	31
V_{ac} Acetat-Umsatzrate [nmol min⁻¹ cm⁻³]	0,29 ± 0,03	0,73 ± 0,04	0,79 ± 0,02	0,53 ± 0,09	0,71 ± 0,01
RI-Wert	0,15 ± 0,04	0,30 ± 0,17	0,51 ± 0,03	0,61 ± 0,05	0,47 ± 0,04
P_{ac} CH₄-Produktion, berechnet aus dem Umsatz von Acetat [nmol min⁻¹ cm⁻³]	0,36 ± 0,09	0,51 ± 0,03	0,39 ± 0,01	0,20 ± 0,04	0,37 ± 0,01
Tatsächliche CH₄-Produktionsrate [nmol min⁻¹ cm⁻³]	0,46 ± 0,03	0,29 ± 0,03	0,17 ± 0,01	0,14 ± 0,01	0,12 ± 0,01

Tabelle 7.2: Umsatz von [2-¹⁴C]Acetat und Methanogenese in Sedimentaufschlämmungen des Profundalsedimentes aus Lake Kinneret vom 10.6.1999 in einer Tiefe von 6 - 20 cm bei einer Inkubationstemperatur von 30°C. Daten zeigen Mittelwerte von 3 parallelen Ansätzen ± Standardfehler

Parameter	5 - 8 cm	8 -11 cm	11 - 14 cm	14 - 17 cm	17 - 20 cm
Maximaler Anteil des aus dem zugegebenen [2- ¹⁴ C]Acetat gebildeten ¹⁴ CH ₄ und ¹⁴ CO ₂	0,38 ± 0,02	0,28 ± 0,05	0,27 ± 0,01	0,29 ± 0,03	0,22 ± 0,02
T _t Acetat-Umsatz-Zeit [min]	14,6 ± 2,5	22,6 ± 3,2	24,9 ± 0,7	17,25 ± 0,36	17,2 ± 1,6
C _{ac} Acetat-Konzentration [nmol cm ⁻³]	25	25	25	25	25
V _{ac} Acetat-Umsatzrate [nmol min ⁻¹ cm ⁻³]	0,68 ± 0,09	0,29 ± 0,06	0,26 ± 0,01	0,39 ± 0,03	0,32 ± 0,04
RI-Wert	0,48 ± 0,03	0,31 ± 0,11	0,28 ± 0,02	0,21 ± 0,06	0,28 ± 0,04
P _{ac} CH ₄ -Produktion, berechnet aus dem Umsatz von Acetat [nmol min ⁻¹ cm ⁻³]	0,35 ± 0,04	0,20 ± 0,04	0,18 ± 0,01	0,39 ± 0,03	0,23 ± 0,03
Tatsächliche CH ₄ -Produktionsrate [nmol min ⁻¹ cm ⁻³]	0,06 ± 0,01	0,003 ± 0,001	0,043 ± 0,001	0,036 ± 0,001	0,16 ± 0,01

3. Ergebnisse

Tabelle 7.4: Umsatz von [2-¹⁴C]Acetat und Methanogenese in Sedimentaufschlämmungen des Profundalsedimentes aus Lake Kinneret vom 10.6.1999 in einer Tiefe von 6 - 20 cm bei einer Inkubationstemperatur von 15°C. Daten zeigen Mittelwerte von 3 parallelen Ansätzen ± Standardfehler

Parameter	5 - 8 cm	8 -11 cm	11 - 14 cm	14 - 17 cm	17 - 20 cm
Maximaler Anteil des aus dem zugegebenen [2-¹⁴C]Acetat gebildeten ¹⁴CH₄ und ¹⁴CO₂	0,06 ± 0,01	0,03 ± 0,01	0,06 ± 0,02	0,06 ± 0,01	0,12 ± 0,01
T_t Acetat-Umsatz-Zeit [min]	56,0 ± 12,2	51,5 ± 10,1	13,1 ± 3,8	52,3 ± 19,7	33,6 ± 3,2
C_{ac} Acetat-Konzentration [nmol cm⁻³]	25	25	25	25	25
V_{ac} Acetat-Umsatzrate [nmol min⁻¹ cm⁻³]	0,03 ± 0,01	0,02 ± 0,01	0,07 ± 0,03	0,05 ± 0,01	0,09 ± 0,01
RI-Wert	0,82 ± 0,13	0,92 ± 0,13	0,46 ± 0,07	0,61 ± 0,14	0,24 ± 0,05
P_{ac} CH₄-Produktion, berechnet aus dem Umsatz von Acetat [nmol min⁻¹ cm⁻³]	0,02 ± 0,01	0,001 ± 0,001	0,04 ± 0,01	0,02 ± 0,01	0,07 ± 0,01
Tatsächliche CH₄-Produktionsrate [nmol min⁻¹ cm⁻³]	0,014 ± 0,001	0,003 ± 0,001	0,012 ± 0,001	0,009 ± 0,001	0,004 ± 0,001

Die Daten in den Tabellen 7.1 bis 7.4 zeigen deutlich, dass die Methanbildung aus Acetat von der Tiefe im Sediment abhängig war. So nahm die Acetatkonzentration in den oberen 5 cm kontinuierlich von 55 auf 25 nmol cm⁻³ Sedimentaufschlammung in den unteren 20 cm ab. Die deutlichste Abnahme war in den oberen 5 cm zu sehen, während in den nächsten 15 cm die Konzentrationen konstant blieben. Bei den Umsatzzeiten (T_t) in den oberen 5 cm ist eine Abnahme von 30 auf 10 min bei 30°C (Tabelle 7.1) und von 44 auf 20 min bei 15°C (Tabelle 7.3) gemessen worden. Eine Ausnahme ist die Schicht von 4 cm, wo sowohl bei 30°C als auch bei 15°C eine längere Umsatzzeit festzustellen war. In der Schicht von 5 bis 15 cm war keine einheitliche Zu- oder Abnahme in der Umsatzzeit bei 15°C und 30°C zu beobachten (Tabelle 7.2 und 7.4). Parallel zu der Abnahme der Umsatzzeit nahm die Umsatzrate (V_{Ac}) von Acetat deutlich zu. Einen deutlichen Unterschied zwischen den Ansätzen bei 30°C und denen bei 15°C ergab die Bestimmung des RI-Wertes. So waren die RI-Werte bei 15°C immer höher als bei 30°C. Bis auf die Schicht 1 cm, die bei 30°C inkubiert wurde, lagen die RI-Werte immer über 0,2. In der Schicht 4 cm, bei 15°C inkubiert, war der RI-Wert 1 (Tabelle 7.3), was sich dadurch ergab, dass kein ¹⁴CH₄, sondern nur ¹⁴CO₂ produziert wurde. Für die Überprüfung, ob die Umsatzrate von Acetat und die vorhandene Acetatkonzentration im Sediment für die gemessene CH₄-Produktion ausreichen, wurden aus den Acetatumsatzraten (V_{Ac}) und den dazugehörigen RI-Werten die Acetat-abhängige CH₄-Produktionsrate (P_{Ac}) berechnet. Bei der Inkubation der Schicht 1 cm bei 30°C lag sie unter der totalen CH₄-Produktionsrate. Für alle anderen Schichten, die bei 30°C inkubiert wurden, war P_{Ac} größer als die tatsächlichen CH₄-Produktionsraten.

Bei 15°C waren die Acetat-abhängigen CH₄-Produktionsraten höher als die tatsächlichen CH₄-Produktionsraten ausgenommen die Schichten 3, 4 und 9 - 11 cm (Tabellen 7.3, 7.4).

Zur Bestimmung des Umsatzes von Acetat in den Sedimenten der Stationen F und S wurden identische Versuche mit [2-¹⁴C]Acetat, wie mit dem Sediment der Station A durchgeführt.

Tabelle 8: Umsatz von $[2\text{-}^{14}\text{C}]$ Acetat und Methanogenese in Sedimentaufschlämmungen der Sedimente von Station F und S aus Lake Kinneret aus 1 - 15 cm Tiefe vom 16.6.1999. Daten zeigen Mittelwerte von 3 parallelen Ansätzen \pm Standardfehler

Parameter	Station F 30°C	Station F 15°C	Station S 30°C	Station S 15°C
Maximaler Anteil des aus dem zugegebenen $[2\text{-}^{14}\text{C}]$ Acetat gebildeten $^{14}\text{CH}_4$ und $^{14}\text{CO}_2$	$0,26 \pm 0,04$	$0,21 \pm 0,01$	$0,28 \pm 0,05$	$0,27 \pm 0,02$
T_t Acetat-Umsatz-Zeit [min]	$34,4 \pm 4,3$	$56,2 \pm 5,1$	$22,4 \pm 2,5$	$25,8 \pm 5,9$
C_{ac} Acetat-Konzentration [nmol cm^{-3}]	37	37	39	39
V_{ac} Acetat-Umsatzrate [nmol $\text{min}^{-1} \text{cm}^{-3}$]	$0,27 \pm 0,04$	$0,14 \pm 0,02$	$0,53 \pm 0,13$	$0,43 \pm 0,08$
RI-Wert	$0,19 \pm 0,02$	$0,23 \pm 0,04$	$0,19 \pm 0,02$	$0,25 \pm 0,02$
P_{ac} CH_4 -Produktion, berechnet aus dem Umsatz von Acetat [nmol $\text{min}^{-1} \text{cm}^{-3}$]	$0,22 \pm 0,02$	$0,11 \pm 0,02$	$0,47 \pm 0,11$	$0,32 \pm 0,05$
Tatsächliche CH_4 -Produktionsrate [nmol $\text{min}^{-1} \text{cm}^{-3}$]	$0,016 \pm 0,001$	$0,006 \pm 0,001$	$0,048 \pm 0,003$	$0,0242 \pm 0,003$

Bei Station F war die Umsatzzeit von Acetat bei 15°C nahezu doppelt so groß wie bei 30°C (Tabelle 8). Die RI-Werte lagen mit 0,19 bei 30°C bzw. 0,23 bei 15°C im Bereich, der für die Methanogenese normal ist. Da die acetoklastischen Methanproduktionsraten (P_{ac}) größer waren als die Gesamtmethanproduktionsraten, waren der Acetatumsatz und die Acetatkonzentrationen im Porenwasser in diesem Sediment sowohl bei 15°C als auch bei 30°C nicht limitierend.

Der Unterschied zwischen den Umsatzraten bei 15°C und 30°C mit 22,3 min bzw. 25,8 min war im Sediment der Station S nicht sehr groß. Auch waren die Acetatumsatzraten (V_{ac}) mit 0,53 und 0,44 größer als im Sediment der Station F (0,27 und 0,14). Es gab auch bei diesem Sediment keine Limitierung der acetatabhängigen Methanogenese.

Da für die Experimente mit $[2-^{14}C]$ Acetat die Sedimentaufschlämmungen für die 30°C-Inkubationen 1 d und für die 15°C-Inkubationen mindestens 2 d vorinkubiert wurden, wurde in einem zusätzlichen Experiment der Einfluss der Dauer der Vorinkubation auf den RI-Wert untersucht. Über einen Zeitraum von 14 d lagen bei den Inkubationen bei 30°C die RI-Werte innerhalb eines Bereiches von $0,38 \pm 0,02$ (Abbildung 15).

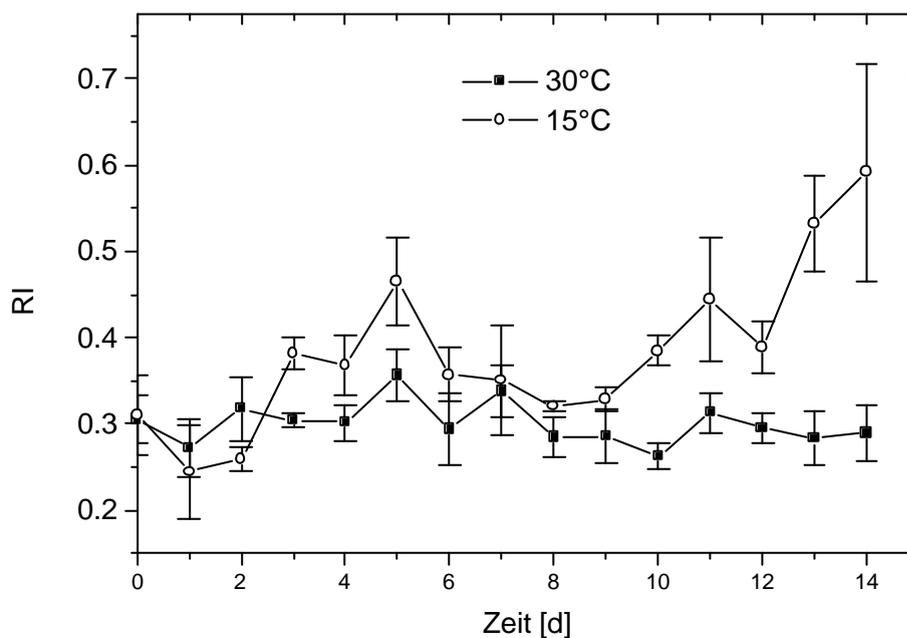


Abbildung 15: RI-Werte in Sedimentaufschlämmungen des Profundalsediments aus Lake Kinneret aus 0 - 3 cm Tiefe vom 03.08.1999 in Abhängigkeit der Dauer der Vorinkubation. Die Vorinkubation wurde zum Zeitpunkt $t = 0$ begonnen. Daten zeigen Mittelwerte von 3 parallelen Ansätzen \pm Standardfehler

Wurden die Sedimentaufschlämmungen bei 15°C vorinkubiert, war eine Zu- und Abnahme des RI-Wertes innerhalb des Zeitraumes 2-8 d und danach ein stetige Zunahme zu beobachten.

In einem weiteren Versuch wurde untersucht, ob die Zugabe von Acetat zu Sedimentaufschlämmungen den RI-Wert verändert. Dazu wurde direkt nach dem zweiten

Be- und Entgasungsvorgang Acetat in einer Konzentration von 1 mM (Endkonzentration) in die Kulturröhrchen gegeben. Zu den Zeitpunkten $t = 0$ d, 1 d und 2 d bei 30°C und $t = 0$ d, 1 d und 8 d bei 15°C wurde wie in 2.8.5.1 [$2\text{-}^{14}\text{C}$]Acetat dazugegeben und nach dessen erfolgtem Umsatz der RI-Wert bestimmt. Wie man in Tabelle 9 sieht, nehmen die RI-Werte sowohl bei 30°C als auch bei 15°C kontinuierlich mit der Inkubationszeit ab.

Tabelle 9: RI-Werte von Ansätzen bei 30°C und 15°C mit Profundalsediment aus Lake Kinneret aus 0 - 3 cm Tiefe vom 03.08.1999, die zum Zeitpunkt $t = 0$ mit 1 mM Acetat versetzt wurden. Daten zeigen Mittelwerte von 3 parallelen Ansätzen \pm Standardfehler

Zeit nach Zugabe von 1 mM Acetat [d]	30°C RI-Wert	15°C RI-Wert
1	0,16 \pm 0,01	0,16 \pm 0,02
2	0,15 \pm 0,00	0,17 \pm 0,01
3	0,14 \pm 0,01	
8		0,13 \pm 0,01

3.2.4 Bestimmung des Anteils der Methanbildung aus H_2/CO_2 im Sediment von Lake Kinneret

Wie auch bei den Experimenten mit [$2\text{-}^{14}\text{C}$]Acetat wurden auch bei den Experimenten mit [^{14}C]Bicarbonat die einzelnen Schichten im Profundalsediment untersucht. Abbildung 16 A zeigt, dass die Equilibrierung von [^{14}C]Bicarbonat zwischen der Flüssig- und Gasphase 50 und 100 h benötigte.

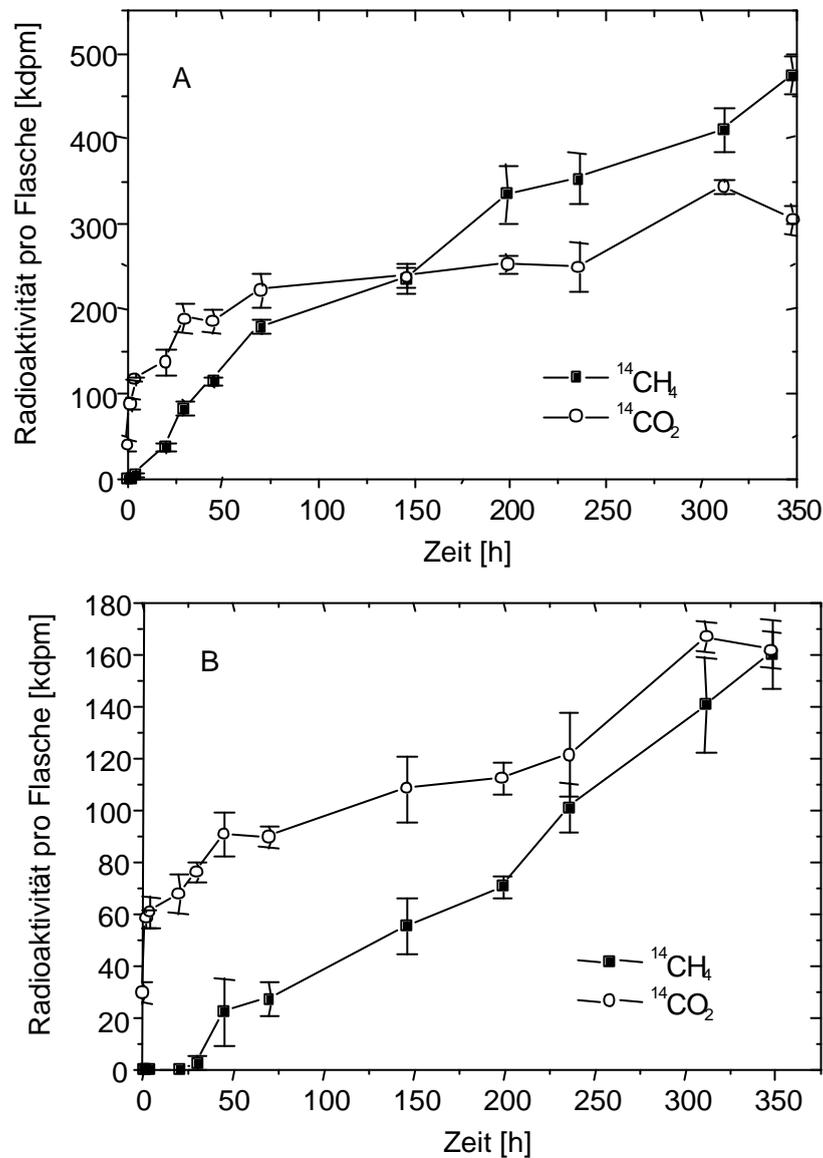


Abbildung 16: Bildung von $^{14}\text{CH}_4$ aus zugegebener [^{14}C]Bicarbonatlösung inkubiert bei 30°C (A) und 15°C (B). Sediment wurde aus der Schicht 1 cm verwendet. Es wurde Profundalsediment vom 10.6.1999 verwendet. Daten zeigen Mittelwerte von 3 parallelen Ansätzen \pm Standardfehler

Wurde bei 15°C inkubiert, war die $^{14}\text{CH}_4$ -Produktion verlangsamt und niedriger als bei 30°C (Abbildung 16 B).

Zur Bestimmung des Anteils der H_2/CO_2 -abhängigen Methanbildung an der Gesamtmethanbildung wurde der f-Faktor bestimmt (s. Kapitel 2.9.4.3: Gleichung 7). Abbildung 17 A zeigt, dass bei 30°C die spezifische Radioaktivität des CO_2 unmittelbar nach

der Zugabe am höchsten war und dann kontinuierlich abnahm. Die spezifische Radioaktivität des CH_4 stieg in den ersten 50 h an und blieb dann auf einem konstanten Niveau. Der f-Faktor zeigte einen zur Abnahme der spezifischen Radioaktivität von CO_2 umgekehrt proportionalen Verlauf. Nach einsetzender ^{14}C -Produktion stieg er auf 0,25, ging dann auf 0,55 und hatte als letzten gemessenen Wert 0,78.

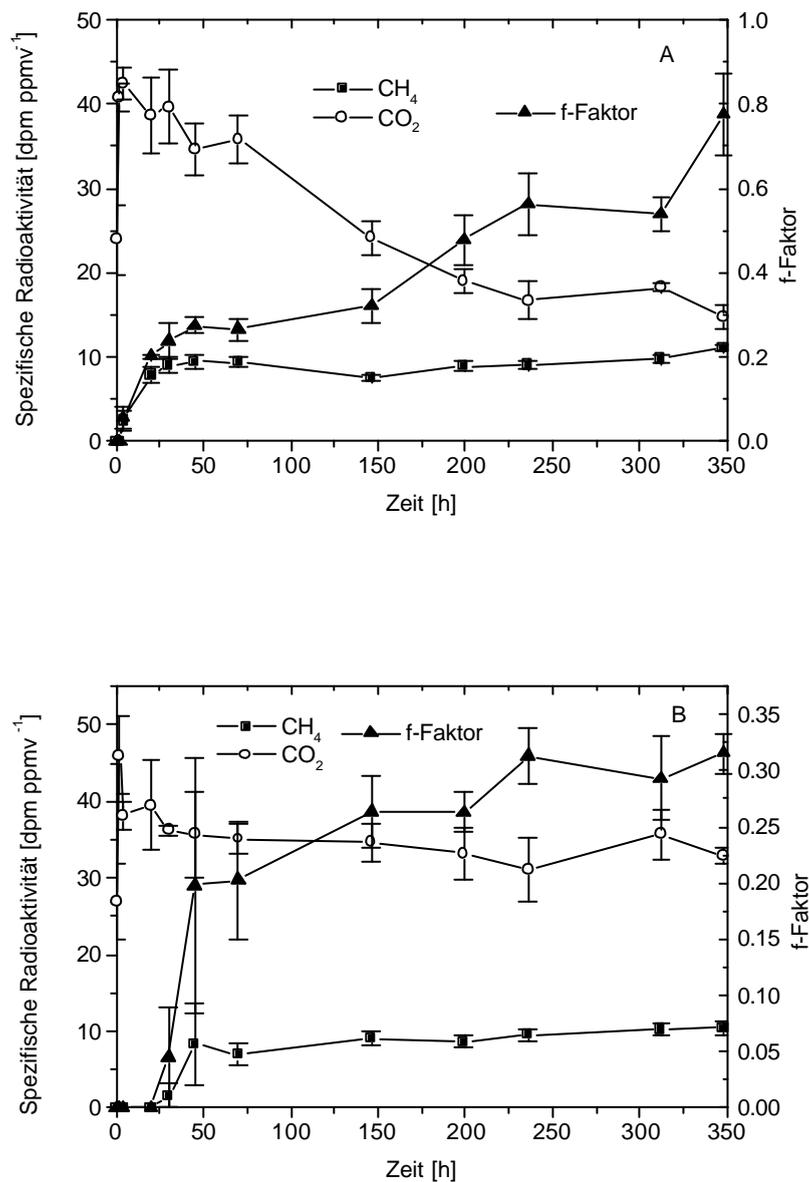


Abbildung 17: Spezifische Radioaktivitäten von CH_4 und CO_2 und der f-Faktor der Schicht 1cm vom 10.6.1999 nach Zugabe von ^{14}C -Bicarbonat inkubiert bei 30°C (A) und 15°C (B). Daten zeigen Mittelwerte von 3 parallelen Ansätzen \pm Standardfehler

Im Vergleich zu den bei 30°C erhaltenen Daten waren sowohl die spezifischen Radioaktivitäten von CH₄ und CO₂ als auch der f-Faktor bei einer Inkubation bei 15°C nach 75 h konstant (Abbildung 16 B).

Der f-Faktor stieg erst auf einen Wert von 0,27 und erreichte gegen Ende der Inkubation einen Wert von 0,33. Hierbei ist schon zu erkennen, dass der f-Faktor bei diesen gezeigten Inkubationen temperaturabhängig war. Bei 30°C war er größer als bei 15°C, was bedeutet, dass der Anteil der H₂/CO₂-abhängigen Methanbildung bei höheren Inkubationstemperaturen größer war als bei niedrigen. Dies ließ sich auch bei den übrigen Ansätzen mit den Schichten 2-20 cm aus dem Profundal deutlich zeigen.

Tabelle 10: f-Faktoren der Schichten 1 - 20 cm, inkubiert bei 30°C und 15°C, erhalten durch die Zugabe von [¹⁴C]Bicarbonat zu Profundalsediment vom 10.6.1999. Die Daten zeigen die Mittelwerte von jeweils 3 parallelen Ansätzen, gemittelt im Zeitraum 200 bis 550 h ± Standardfehler:

Schichttiefe [cm]	f-Faktor	
	30°C	15°C
1	0,459 ± 0,070	0,289 ± 0,012
2	0,518 ± 0,029	0,347 ± 0,046
3	0,441 ± 0,017	0,327 ± 0,048
4	0,351 ± 0,019	0,115 ± 0,000
5	0,475 ± 0,018	0,190 ± 0,009
5 - 8	0,457 ± 0,018	0,344 ± 0,023
8 - 11	0,403 ± 0,024	0,284 ± 0,039
11 - 14	0,506 ± 0,032	0,254 ± 0,033
14 - 17	0,428 ± 0,025	0,229 ± 0,043
17 - 20	0,398 ± 0,020	0,191 ± 0,023

Der f-Faktor lag bei 30°C überwiegend zwischen 0,4 und 0,5. Die Ausnahmen waren hierbei die Schicht 4 cm und die Schicht 17 - 20 cm mit Werten von 0,35 bzw. 0,39. Bei 15°C lagen die f-Faktoren im Durchschnitt aller Schichten von 0,25 ± 0,02 niedriger als bei 30°C mit 0,45 ± 0,03. Wie auch schon bei dem Experiment mit [2-¹⁴C]Acetat war auch hier in der Schicht 4 cm bei 15°C nur eine sehr schwache ¹⁴CH₄-Produktion detektiert worden, welche auch den niedrigen f-Faktor von 0,115 erklärt.

Wie im Profundalsediment wurden auch in den Sedimenten der Stationen F und S ein Temperaturabhängigkeit der H_2/CO_2 -abhängigen Methanogenese gefunden (Tabelle 11). Bei 30°C wurde sowohl im Sediment der Station F als auch bei dem Sediment der Station S ein größerer Anteil des Methans aus H_2/CO_2 gebildet, als bei 15°C.

Tabelle 11: f-Faktoren der Sedimente der Stationen F und S aus 1 - 15 cm Tiefe, inkubiert bei 30°C und 15°C, erhalten durch die Zugabe von [^{14}C]Bicarbonat zu Sediment vom 16.6.1999. Die Daten zeigen die Mittelwerte von jeweils 3 parallelen Ansätzen, gemittelt im Zeitraum 120 bis 550 h \pm Standardfehler

Sediment aus Station	f-Faktor	
	30°C	15°C
F	0,35 \pm 0,01	0,24 \pm 0,02
S	0,52 \pm 0,02	0,37 \pm 0,02

Durch die Bilanzierung der Gesamt-Radioaktivität, die am Ende eines Versuches ermittelt wurde, wurde überprüft, ob die zugegebene Menge an Radioaktivität in den Produkten $^{14}CH_4$ und $^{14}CO_2$ wiedergefunden wurde, oder ob es noch einen Teil von unverbrauchtem Substrat in den Sedimentaufschlämmungen gab.

Bei den Versuchen mit [$2-^{14}C$]Acetat wurden in den Ansätzen, die bei 30°C inkubiert wurden 70 \pm 10 % an Radioaktivität wiedergefunden. Bei 15°C wurden 65 \pm 15% nachgewiesen. Wurde [^{14}C]Bicarbonat dazugegeben, stimmte die Bilanz bei 30°C zu 78 \pm 2% und bei 15°C zu 75 \pm 5% mit der Menge an zugegebener Radioaktivität überein.

3.2.5 Untersuchungen zur Isotopensignatur von CH_4 und CO_2 im Lake Kinneret

Mit Hilfe der Bestimmung der stabilen Isotopensignatur des im Sediment gebildeten Methans und Kohlendioxyds kann deren Substratspezifität bestimmt werden (Whiticar 1996 und 1999). Durch Versuche, die an Reinkulturen mit unterschiedlichen Substraten durchgeführt wurden, wurde eine substratspezifische Einordnung der $\delta^{13}CH_4$ -Werte ermöglicht (Games und Hayes 1978, Krzycki et al. 1987). Mit diesen Werten als Anhaltspunkt ergab sich dann die Möglichkeit, in Umweltproben die Herkunft des dort produzierten Methans nach dessen verwendetem Substrat einzuordnen (Burke et al. 1992, Sugimoto und Wada 1993, Thebrath et al. 1993, Jedrysek 1995, Whiticar et al 1996, Avery et al. 1999).

Für die Bestimmung der Isotopensignatur im produzierten CH_4/CO_2 in Lake Kinneret wurde die Gasphase von Sedimentaufschlämmungen im GC-IRMS analysiert. Hierbei wurden zweierlei Aspekte betrachtet: Wie verändert sich die Isotopensignatur in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer bei 30°C und 15°C und verändert sich die Isotopensignatur in Abhängigkeit von der Tiefe im Sediment?

Für die erste Frage wurde Sediment vom 03.08.99 in Sedimentaufschlämmungen angesetzt und bei 30°C und 15°C inkubiert.

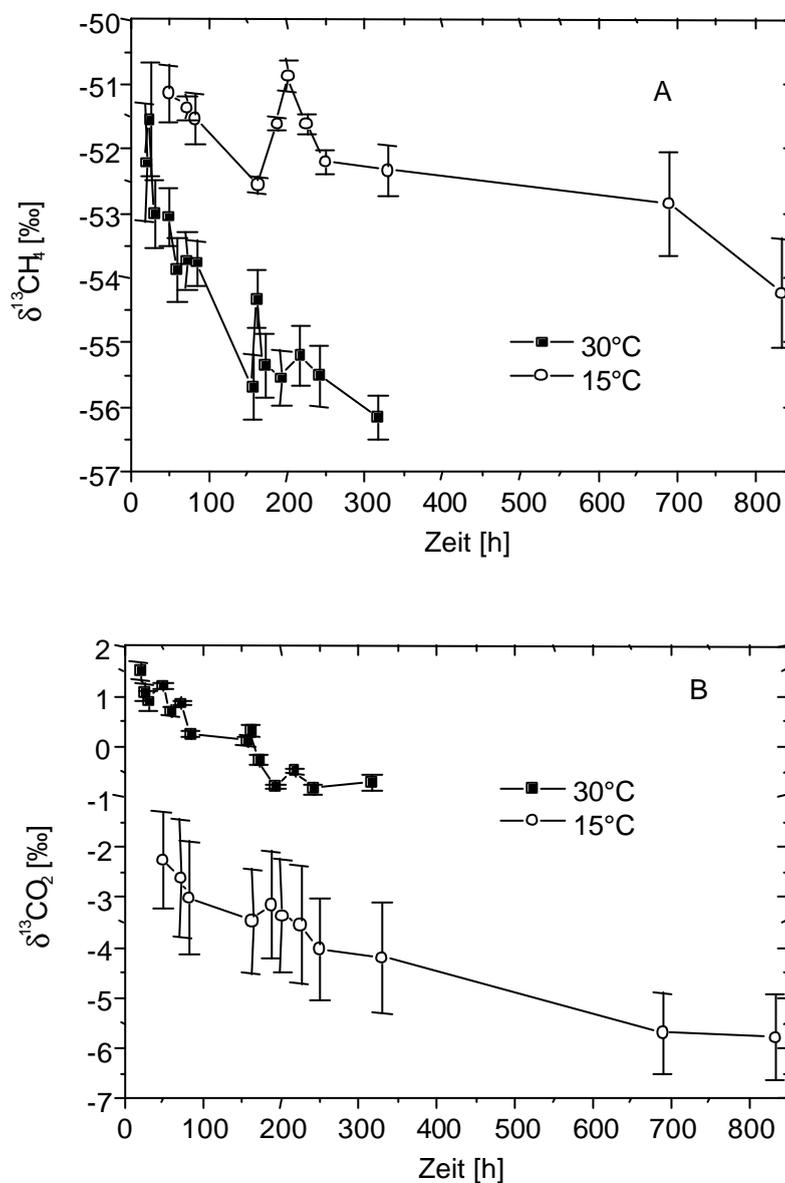


Abbildung 18: $\delta^{13}\text{CH}_4$ [‰] (A) und $\delta^{13}\text{CO}_2$ [‰] (B) in Sedimentaufschlämmungen mit Sediment aus 0-3 cm Tiefe vom 03.08.1999 inkubiert bei 30°C und 15°C . Daten zeigen Mittelwerte von 3 parallelen Ansätzen \pm Standardfehler

Abbildung 18 A und B zeigt, dass mit zunehmender Inkubationszeit die $\delta^{13}\text{CH}_4$ -Werte sowohl in den Ansätzen bei 30°C als auch in den Ansätzen bei 15°C negativer, das heißt leichter wurden. Der gleiche Trend ist auch bei den $\delta^{13}\text{CO}_2$ -Werten zu sehen. Die $\delta^{13}\text{CO}_2$ -Werte waren am Anfang positiv und wurden erst im Verlauf der Inkubation negativ, was bedeutet, dass das CO_2 , welches im Profundalsediment gebildet wurde, einen hohen Anteil an ^{13}C hat. Die Berechnung des Fraktionierungsfaktors α_c ergab folgendes:

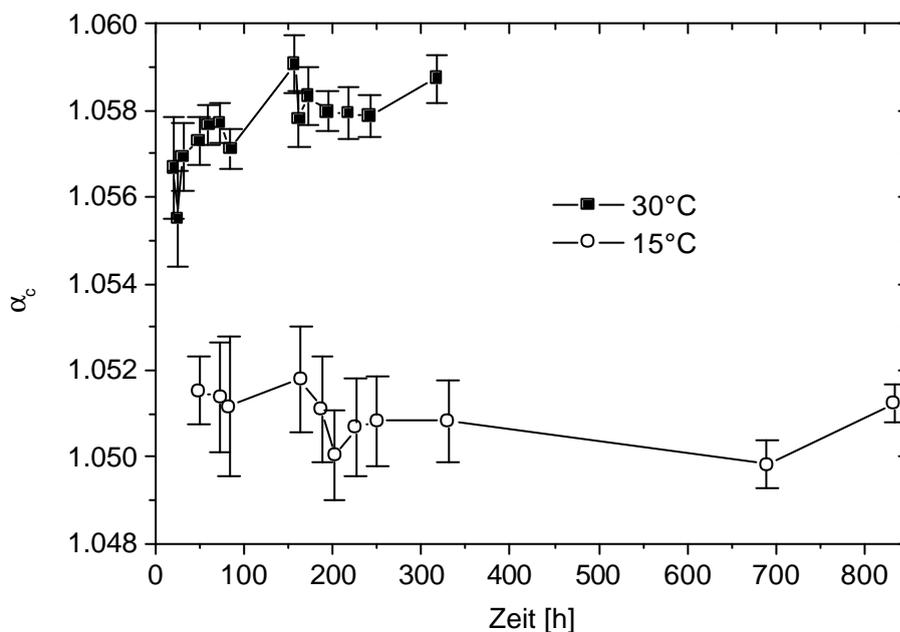


Abbildung 19: Fraktionierungsfaktor α_c , berechnet aus $\delta^{13}\text{CH}_4$ und $\delta^{13}\text{CO}_2$ für die Inkubationen bei 30°C und 15°C mit Sediment aus 0 - 3 cm Tiefe vom 03.08.1999. Daten zeigen Mittelwerte von 3 parallelen Ansätzen \pm Standardfehler

Bei 30°C lag α_c am Anfang bei 1,055 und wurde dann mit der Inkubationsdauer größer, so dass er am Ende bei 1,058 lag (Abbildung 19). α_c lag bei 15°C vom Anfang an bei 1,051 und blieb während der ganzen Inkubationszeit in diesem Bereich. Die Abhängigkeit von $\delta^{13}\text{CH}_4$ und $\delta^{13}\text{CO}_2$ von der Schichttiefe im Sediment wurde nur zu einem Zeitpunkt innerhalb einer Inkubation, die über 100 h ging, bestimmt.

Tabelle 12.1: $\delta^{13}\text{CH}_4$, $\delta^{13}\text{CO}_2$ und α_c aus Sedimentaufschlammungen der Schichten 1 - 20 cm des Profundalsedimentes vom 10.6.1999 bei 30°C. Daten wurden zum Zeitpunkt $t = 144$ h erhoben

Tiefe im Sediment [cm]	$\delta^{13}\text{CH}_4$ [‰]	$\delta^{13}\text{CO}_2$ [‰]	α_c
1	-49,62	-2,94	1,049
2	-52,40	-2,58	1,052
3	-54,41	-4,39	1,052
4	-56,28	-6,33	1,053
5	-54,03	-2,54	1,054
5 - 8	-56,17	-0,94	1,058
8 - 11	-55,33	-0,84	1,062
11 - 14	-53,84	0,04	1,057
14 - 17	-53,61	0,86	1,058
17 - 20	-50,89	0,44	1,054

$\delta^{13}\text{CH}_4$ wurde im Tiefenprofil von 0 bis 6-8 cm negativer. Danach wurde es wieder positiver, so dass es in 20 cm Tiefe nahezu den gleichen Wert hatte wie in 1 cm Tiefe. Bei $\delta^{13}\text{CO}_2$ war von der obersten Schicht bis in 20 cm Tiefe eine Zunahme bis ins Positive zu beobachten. Der Fraktionierungsfaktor α_c zeigte einen nahezu parallelen Verlauf mit den $\delta^{13}\text{CH}_4$ -Werten, wobei in der Schicht 8 - 11 cm der größte Wert mit 1,062 errechnet wurde.

Wurden die verschiedenen Schichten bei 15°C inkubiert, dann zeigten $\delta^{13}\text{CH}_4$, $\delta^{13}\text{CO}_2$ und α_c einen anderen tiefenabhängigen Verlauf (Tabelle 12.2).

Tabelle 12.2: $\delta^{13}\text{CH}_4$, $\delta^{13}\text{CO}_2$ und α_c aus Sedimentaufschlammungen der Schichten 1 - 20 cm des Profundalsedimentes vom 10.6.1999 bei 15°C. Daten wurden zum Zeitpunkt $t = 196$ h erhoben

Tiefe im Sediment [cm]	$\delta^{13}\text{CH}_4$ [‰]	$\delta^{13}\text{CO}_2$ [‰]	α_c
1	-49,39	-5,38	1,046
2	-50,26	-5,47	1,047
3	-54,68	-5,57	1,051
4	-57,51	-5,77	1,051
5	-53,66	-3,77	1,053
5 - 8	-58,75	-3,29	1,058
8 - 11	-61,77	-3,58	1,062
11 - 14	-52,65	-0,64	1,055
14 - 17	-54,17	0,82	1,058
17 - 20	-55,5	1,00	1,059

In der Schicht 1 cm war $\delta^{13}\text{CH}_4$ mit -49,39 ‰ am positivsten (Tabelle 12.2). Mit zunehmender Tiefe wurde es immer leichter, wobei in der Tiefe 8 - 11 cm mit -61,77 ‰ der negativste Wert erreicht wurde. Die $\delta^{13}\text{CO}_2$ -Werte zeigten dagegen einen ähnlichen Verlauf, wie er bei den Inkubationen bei 30°C beobachtet wurde. α_c war in der obersten Schicht mit 1,046 niedriger als bei der Inkubation mit 30°C. In der Schicht 8 - 11 cm war α_c genauso groß wie bei 30°C.

Es zeigte sich, dass sich mit zunehmender Tiefe der Fraktionierungsfaktor änderte, sowohl bei 30°C als auch bei 15°C. Eine Analyse des Profundalsedimentes zur Bestimmung des $\delta^{13}\text{C}$ im organischen Kohlenstoff ergab einen Wert von -11,63‰.

Zusätzlich zu den Untersuchungen mit dem Profundalsediment von Station A wurden Ansätze zur CH_4 -Produktionsratenbestimmung der Sedimente der Stationen F und S durchgeführt. Hierbei wurden auch die $\delta^{13}\text{CH}_4$ - und $\delta^{13}\text{CO}_2$ -Werte bestimmt. Dies erfolgte nach 120 h Inkubation.

Tabelle 13: $\delta^{13}\text{CH}_4$, $\delta^{13}\text{CO}_2$ und α_c aus Sedimentaufschlammungen mit Sedimenten der Stationen F und S aus 1 - 15 cm Tiefe vom 16.6.1999 bei 30°C und 15°C. Daten wurden zum Zeitpunkt $t = 120$ h erfasst

	$\delta^{13}\text{CH}_4$ [‰]	$\delta^{13}\text{CO}_2$ [‰]	α_c
Station F 30°C	-57,86	0,06	1,061
Station F 15°C	-57,46	0,16	1,061
Station S 30°C	-60,41	-0,28	1,064
Station S 15°C	-61,59	-1,90	1,063

Im Gegensatz zum Profundalsediment beeinflussten die Inkubationstemperaturen nicht die Diskriminierung zwischen ^{13}C und ^{12}C bei der CH_4 -Produktion in den Sedimenten der Stationen F und S (Tabelle 13). Bei Station F hatte $\delta^{13}\text{CH}_4$ einen Mittelwert von -57,66 ‰ und bei Station S von -61,0 ‰, was deutlich niedriger war als der Durchschnitt bei Station A. Gleichzeitig hatten auch die Fraktionierungsfaktoren α_c einen Wert von 1,061 für Station F bzw. 1,063 für Station S. Diese lagen damit deutlich über den Werten bei Station A.

3.2.6 Stimulierung der Methanogenese im Plußsee und Lake Kinneret mit verschiedenen Substraten: Einfluss der Substrate auf die Isotopensignatur der gebildeten Gase

3.2.6.1 Plußsee

Durch Zugabe von Substraten sollte in den beiden Seen untersucht werden, ob sich die Methanbildung stimulieren lässt. Diese Substrate, Acetat, Butyrat, Formiat, Methanol, Propionat und Wasserstoff, können entweder direkt durch Methanogene verwendet werden oder werden erst noch durch fermentierende Bakterien in die für Methanogene verwertbare Substrate umgesetzt (Zehnder 1978).

In vorbereitete Sedimentaufschlammungen vom Plußsee wurden jeweils 1 mM Acetat, 0,75 mM Methanol, 1 mM Formiat und 4 % Wasserstoff dazugegeben. Wurden die Ansätze bei 25°C inkubiert, dann stimulierten Acetat, Methanol und Wasserstoff die Methanbildung (Anhang, Tabelle 6). Bei 4°C stimulierten nur Formiat und Wasserstoff die Methanbildung (Anhang Tabelle 6).

Parallel zu den Analysen der CH_4 - und CO_2 -Konzentrationen wurde die Isotopensignatur von CH_4 und CO_2 analysiert.

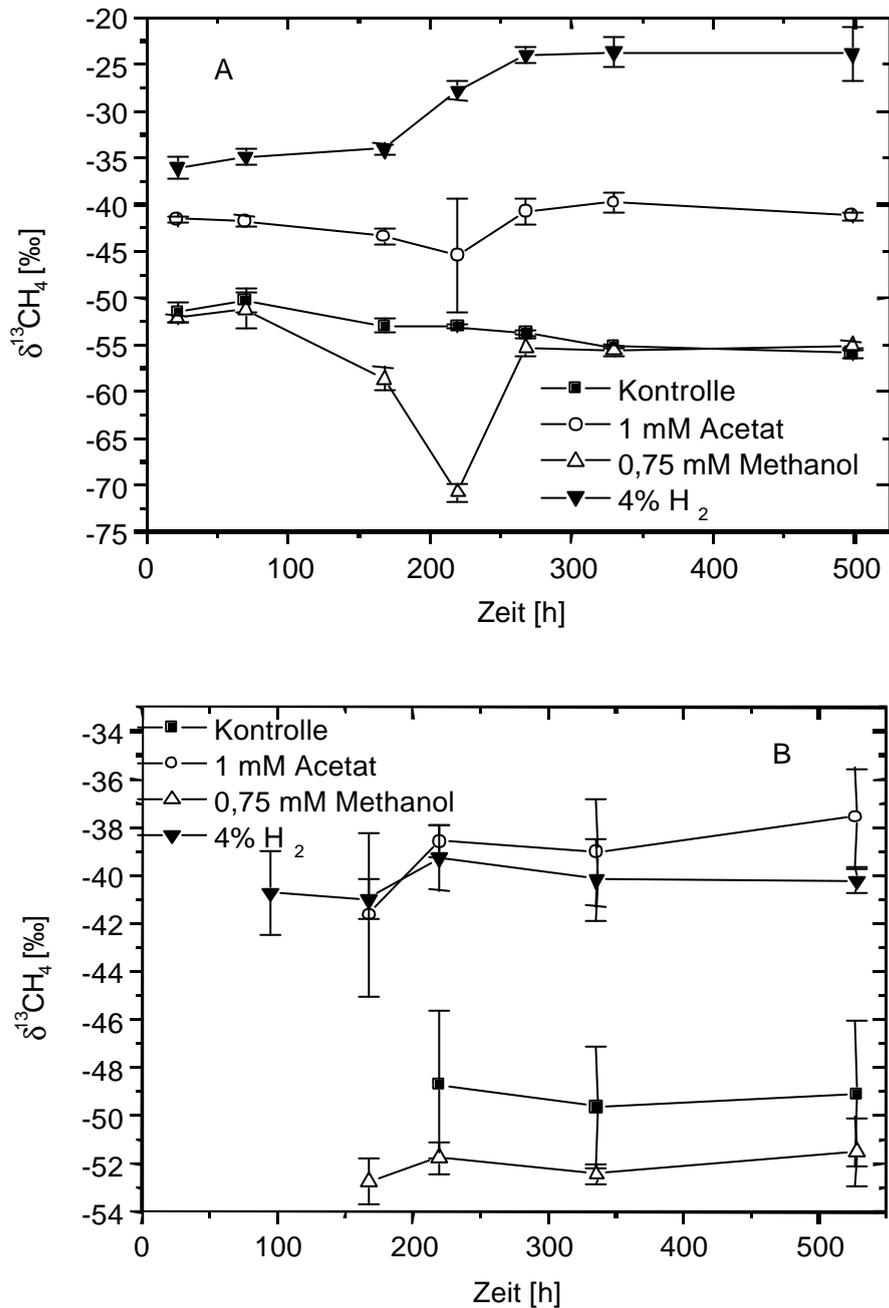


Abbildung 20: $\delta^{13}\text{CH}_4$ [‰] in Sedimentaufschlämmungen mit Sediment aus dem Plußsee vom 26.01.1999, inkubiert bei 25°C (A) und 4°C (B). Zugabe von 1 mM Acetat, 0,75 mM Methanol und 4% H_2 . Daten zeigen jeweils Mittelwerte von 3 parallelen Ansätzen \pm Standardfehler

In den Kontrollansätzen nahm $\delta^{13}\text{CH}_4$ von - 50 ‰ auf - 55 ‰ ab (Abbildung 20 A). Die Zugabe von Acetat resultierte in einer Erhöhung von - 40 bis - 45 ‰. Wurde Methanol dazugegeben, dann hatte $\delta^{13}\text{CH}_4$ bis ca. 75 h den gleichen Wert wie $\delta^{13}\text{CH}_4$ der Kontrollansätze. In dem Zeitraum von 75 bis 220 h kam es dann zu einer starken Abnahme bis auf - 70 ‰. Innerhalb von 50 h kam es danach zum Anstieg auf die gleichen Werte wie in den Kontrollansätzen. Ein gegensätzlicher Verlauf von $\delta^{13}\text{CH}_4$ wurde in den Ansätzen, in die Wasserstoff dazugegeben wurde beobachtet. Hier kam es zu einer Zunahme von dem Ausgangswert von - 35 ‰ innerhalb von 100 h auf den Endwert von - 25 ‰.

Wurden die Ansätze bei 4°C inkubiert, dann waren im Vergleich zu den Inkubationen bei 25°C die Werte unterschiedlich (Abbildung 20 B). Da in den Ansätzen vom Zeitpunkt $t = 0$ an nicht genügend CH_4 für die Analyse im GC-IRMS produziert wurde, begann die Datenaufnahme erst, nachdem in der Gasphase der Sedimentaufschlämmungen mehr als 300 ppmv CH_4 akkumuliert wurde. Die $\delta^{13}\text{CH}_4$ -Werte bei einer Inkubation von 4°C zeigten einen insgesamt gleichmäßigeren Verlauf als die Werte bei den 25°C-Inkubationen (Abbildung 20 B). In den Kontrollansätzen lagen die Werte zwischen -48 ‰ und -50 ‰, also positiver als in den Ansätzen, die bei 25°C inkubiert wurden. Eine Zugabe von Acetat führte zu einer Erhöhung auf - 40 ‰. In den Ansätzen mit Wasserstoff als Substrat lagen die $\delta^{13}\text{CH}_4$ -Werte im gleichen Bereich wie Ansätzen mit Acetat als Substrat. In den 4°C-Ansätzen mit Methanol kam es zu keiner Abnahme von $\delta^{13}\text{CH}_4$ wie bei 25°C.

Bei 25°C waren die $\delta^{13}\text{CO}_2$ -Werte der Kontrollansätze und der Ansätze mit Methanol als Substrat nahezu identisch (Abbildung 21 A) und lagen im positiven Bereich zwischen 0 und 4 ‰. In den Acetat-Ansätzen kam es zu einer Erniedrigung auf - 12 ‰. Die Zugabe von Wasserstoff resultierte in den ersten 170 h in einer Zunahme von 5 auf 50 ‰. Für ca. 70 h blieb dieser Wert konstant und nahm dann langsam bis zu dem Zeitpunkt $t = 500$ auf 20 ‰ ab (Abbildung 21 A). Bei 4°C wurde bei allen Ansätzen eine Abnahme von $\delta^{13}\text{CO}_2$ innerhalb des Inkubationszeitraumes beobachtet (Abbildung 21 B). Diese lag zwischen 1 und 2 ‰.

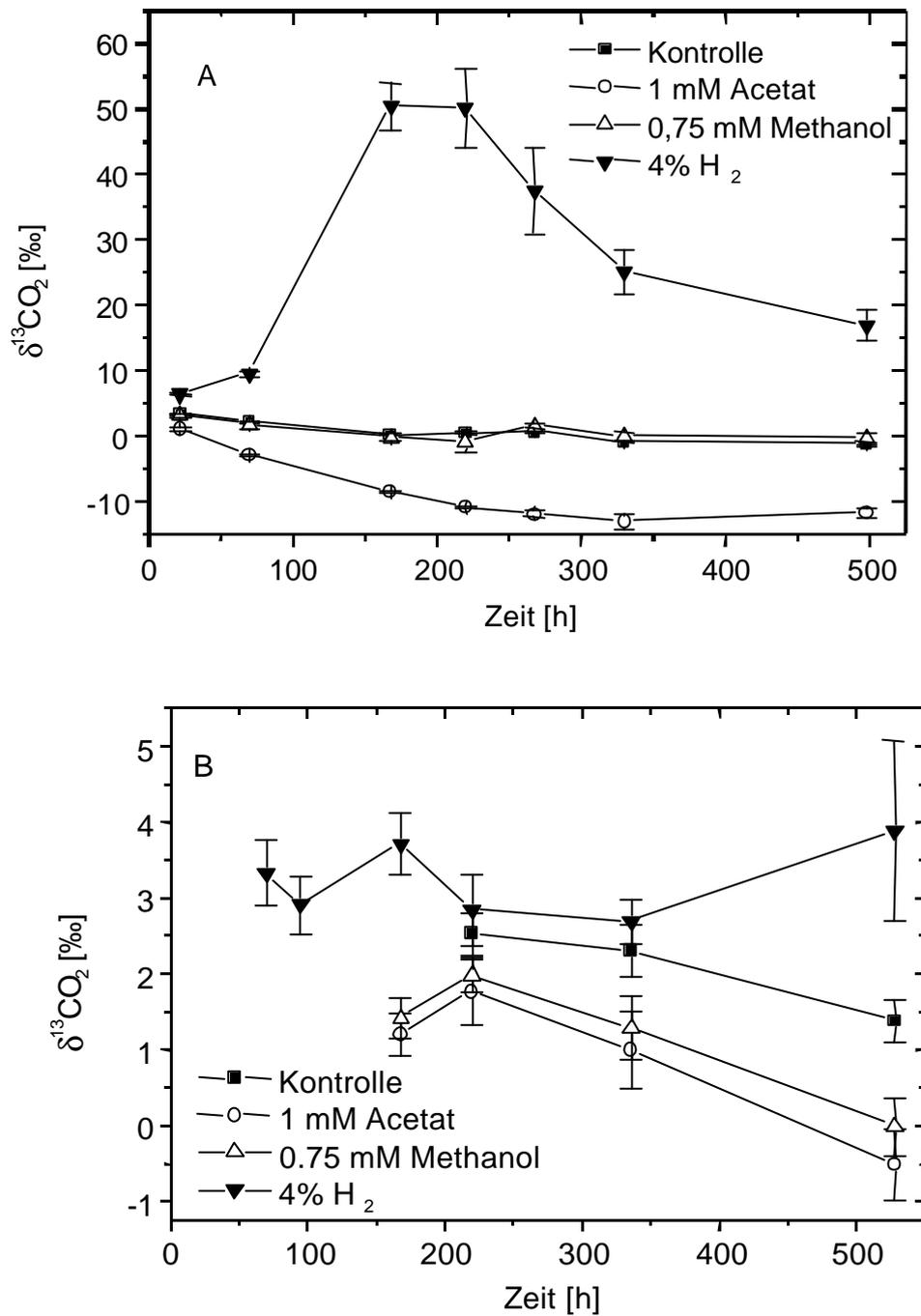


Abbildung 21: $\delta^{13}\text{CO}_2$ [‰] in Sedimentaufschlämmungen mit Sediment aus dem Plußsee vom 26.01.1999, inkubiert bei 25°C (A) und 4°C (B). Zugabe von 1 mM Acetat, 0,75 mM Methanol und 4% H₂. Daten sind jeweils Mittelwerte von 3 parallelen Ansätzen \pm Standardfehler

3.2.6.2 Lake Kinneret

Die Zugabe von Substraten in das Profundalsediment vom Lake Kinneret erfolgte unter zwei Gesichtspunkten: In wieweit stimulieren Acetat, Butyrat, Formiat und Propionat die Methanbildung bei 15°C und 30°C und zweitens, haben eine Zugabe von Acetat, Methanol und Wasserstoff einen Einfluss auf die Isotopensignatur des gebildeten CH₄ bzw. CO₂?

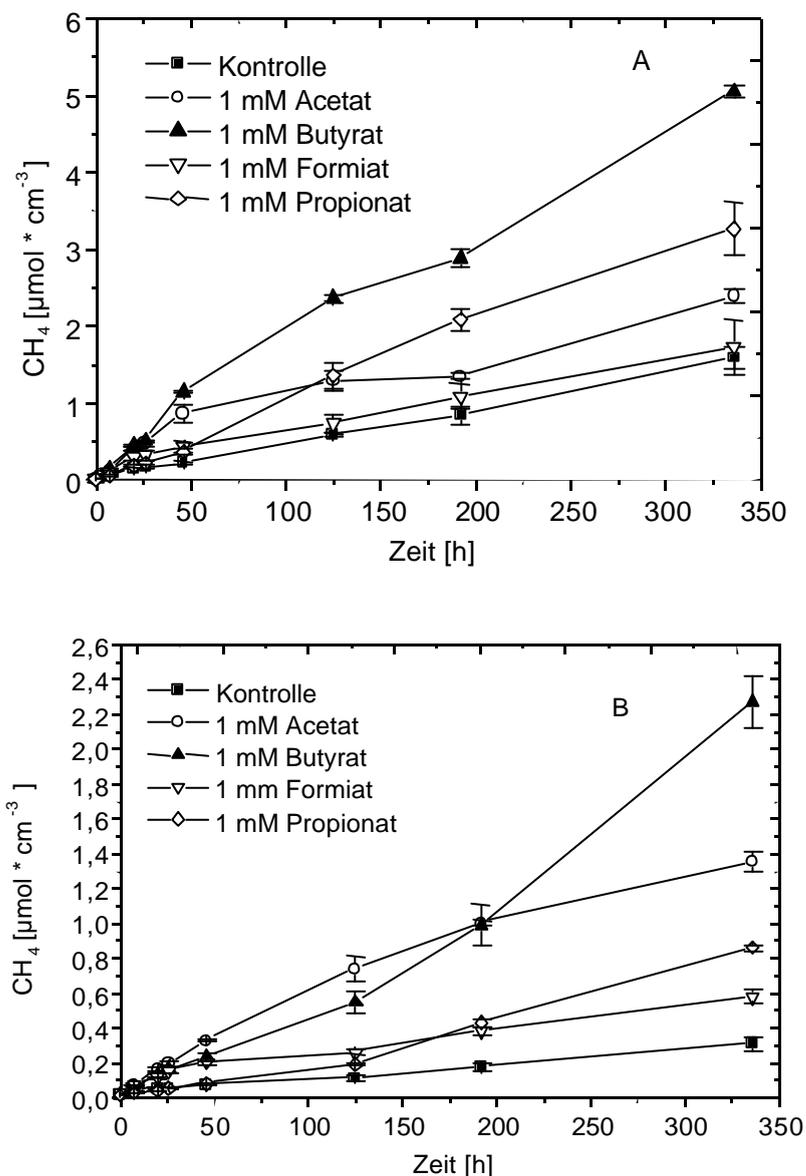


Abbildung 22: CH₄-Produktion im Profundalsediment vom Lake Kinneret [$\mu\text{mol cm}^{-3}$], Sediment aus 0 - 15 cm Tiefe vom 03.08.1998, gemessen in Sedimentaufschlämmungen die bei 30°C (A) bzw. 15°C (B) nach Zugabe von jeweils 1 mM Acetat, 1 mM Butyrat, 1 mM Formiat und 1 mM Propionat inkubiert wurden. Daten zeigen Mittelwerte von 3 parallelen Ansätzen \pm Standardfehler

Alle zugegebenen Substrate stimulierten bei 30°C die CH₄-Produktion (Abbildung 22 A). Acetat war nach ca. 50 h zu CH₄ umgesetzt, da danach die Methanproduktion parallel zur Kontrolle erfolgte. Butyrat stimulierte über den ganzen beobachteten Zeitraum die Methanproduktion. Die Zugabe von Formiat führte nur zu einer schwachen Stimulation der Methanproduktion. Der sichtbare Umsatz von Propionat zu Methan begann erst nach 50 h, die CH₄-Konzentration stieg danach linear an. Die CO₂-Produktion wurde nur durch Butyrat und Propionat stimuliert (Daten nicht gezeigt). Nur die Zugabe von Acetat stimulierte von Anfang an die Methanproduktion bei 15°C (Abbildung 22 B). Das zugegebene Formiat führte nur innerhalb der ersten 50 h zu einer Stimulation der Methanproduktion. Butyrat und Propionat wurden erst nach einer lag-Phase zu CH₄ umgesetzt. Butyrat stimulierte hierbei besser die Methanogenese als Propionat. In den Ansätzen mit zugegebenem Propionat wurde auch im Vergleich zu den Kontrollansätzen mehr CO₂ produziert (Daten nicht gezeigt).

Die H₂-Konzentrationen stiegen in den ersten 50 - 100 h nur in den Ansätzen mit Formiat, Butyrat und Propionat über die Konzentrationen der Kontrollansätze und der Ansätze mit Acetat an (Abbildung 23 A). In den Ansätzen mit Formiat stiegen die H₂-Konzentrationen innerhalb 25 h auf 190 Pa an und nahmen dann bei t = 180h auf 5 Pa wieder ab. Im Gegensatz zu den Ansätzen, die bei 30°C inkubiert wurden, nahmen die H₂-Konzentrationen in den 15°C-Ansätzen während des beobachteten Zeitraumes zu (Abbildung 23 B). Dies galt für die Kontrollansätze und die Ansätze mit Acetat-, Butyrat- und Propionatzugabe. In den Ansätzen, in denen Formiat dazugegeben wurde, stieg die H₂-Konzentration auf 150 Pa innerhalb 50 h an und nahm dann bis zum Ende auf 20 Pa ab (Abbildung 23 B).

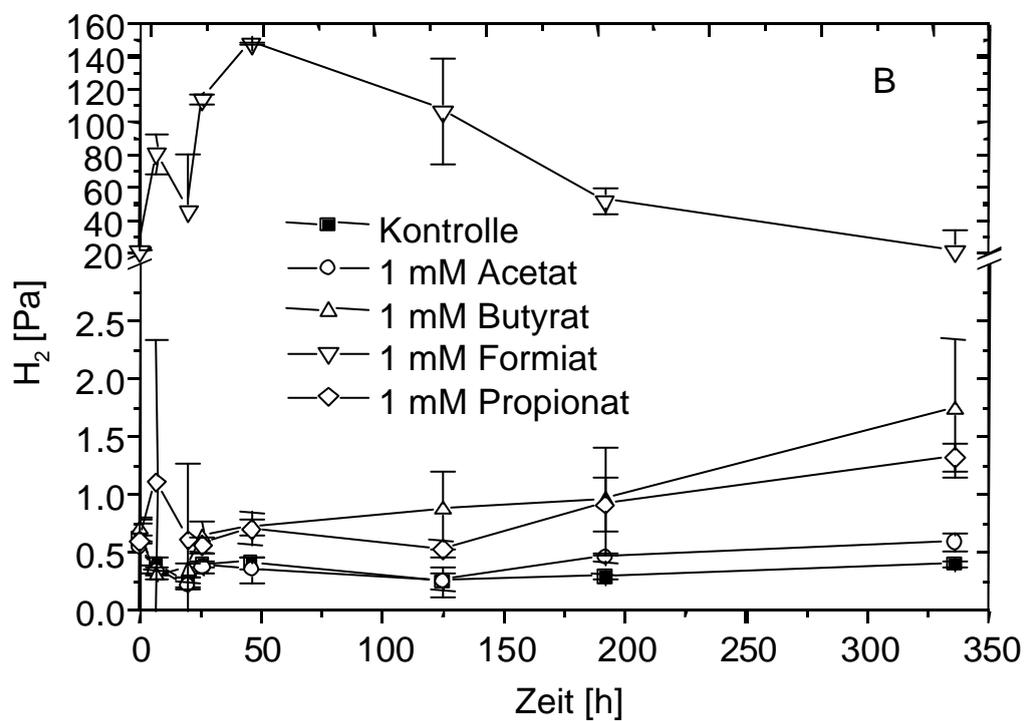
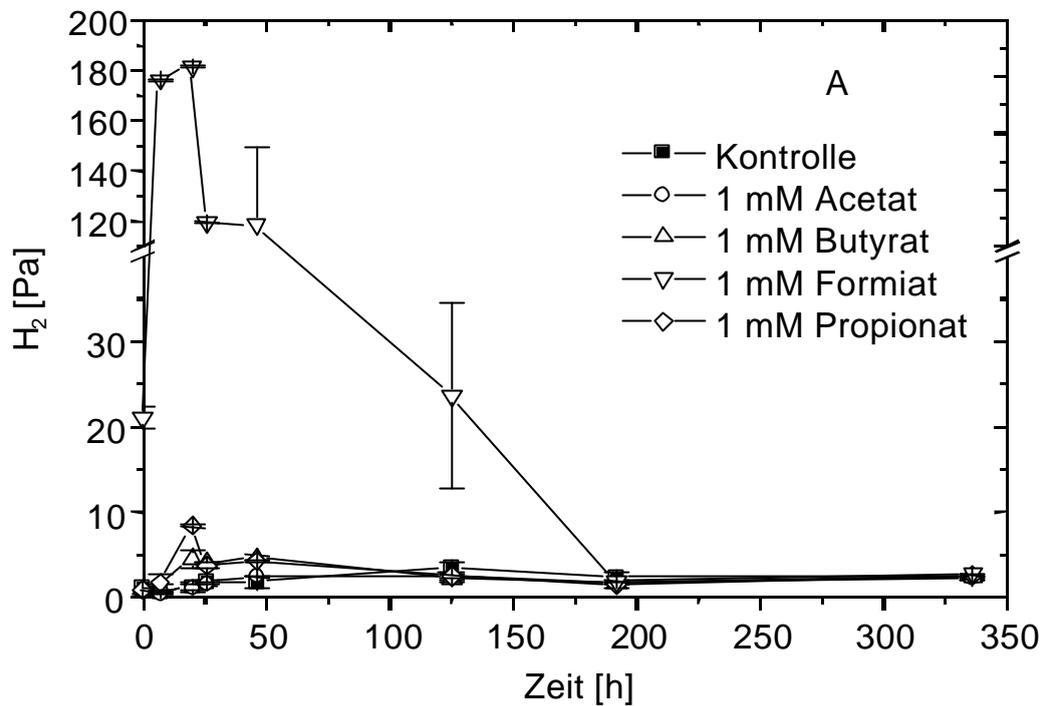


Abbildung 23: H_2 -Konzentrationen [Pa], gemessen in Sedimentaufschlämmungen aus Profundalsediment vom Lake Kinneret, Sediment aus 0 - 15 cm Tiefe vom 03.08.1998, bei 30°C nach Zugabe von jeweils 1 mM Acetat, 1 mM Butyrat, 1 mM Formiat und 1 mM Propionat. Daten zeigen Mittelwerte von 3 parallelen Ansätzen \pm Standardfehler

In einem separaten Versuch, bei dem Acetat, Methanol und Wasserstoff einzeln in vorbereitete Sedimentaufschlämmungen dazugegeben wurden, wurde zusätzlich die Isotopensignatur des gebildeten CH_4 und CO_2 untersucht. Das zugegebene Acetat stimulierte bei 30°C die Methanproduktion und war nach 50 h zu CH_4 umgesetzt, da die CH_4 -Konzentrationen im gleichem Maße wie die CH_4 -Konzentrationen in der Kontrolle zunahm. Die Zugabe von Wasserstoff stimulierte über den gesamten Zeitraum die Methanproduktion (Abbildung 24 A). Wurde Methanol dazugegeben, dann war eine Stimulierung erst nach 75 h zu sehen. Nach 170 h kam es dann zu keiner weiteren Stimulation. Stöchiometrisch wurden aus dem zugegebenem 1 mM Acetat 0,98 mM Methan gebildet, während aus 1 mM Methanol 0,75 mM Methan gebildet worden waren.

Die CO_2 -Konzentrationen zeigten bis auf die Ansätze mit H_2 -Zugabe keine Unterschiede zueinander (Daten nicht gezeigt). In den Ansätzen mit zugegebenem Wasserstoff wurde keine Zunahme der CO_2 -Konzentrationen, sondern eine leichte Abnahme festgestellt. Auch bei den H_2 -Konzentrationen gab es keine Unterschiede zu den vorherigen Ansätzen.

Wurden die Ansätze bei 15°C inkubiert, kam es zu einer verlangsamten CH_4 -Produktion, wie sie in vorherigen Experimenten beobachtet wurde. Nur das zugegebene Acetat und der zugegebene Wasserstoff führten zu einer deutlichen Stimulation vom Beginn der Inkubation an (Abbildung 24 B). Methanol stimulierte in den ersten 250 h nur leicht die Methanproduktion. Nach 250 h kam es dann zu einer starken Stimulation der Methanogenese. Wie auch bei den Ansätzen, die bei 30°C inkubiert wurden, lagen die CO_2 - und H_2 -Konzentrationen der 15°C - Ansätze im Bereich der Konzentrationen früherer Experimente.

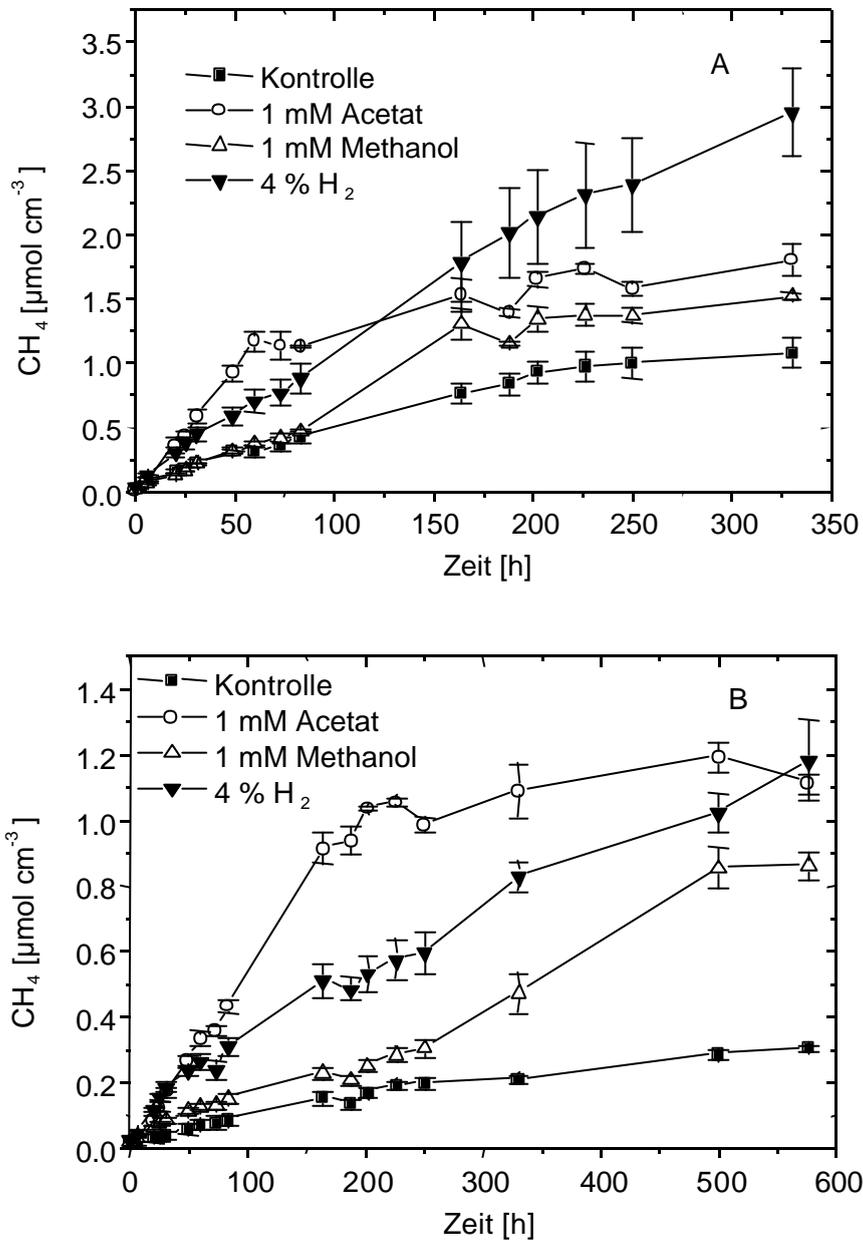


Abbildung 24: CH₄-Produktion [$\mu\text{mol cm}^{-3}$] im Profundalsediment vom Lake Kinneret, Sediment aus 0 - 3 cm Tiefe vom 03.08.1999, gemessen in Sedimentaufschlämmungen die bei 30°C (A) bzw. 15°C (B) nach Zugabe von jeweils 1 mM Acetat, 1 mM Methanol und 4 % H₂ inkubiert wurden. Daten zeigen Mittelwerte von 3 parallelen Ansätzen \pm Standardfehler

Die Bestimmung von $\delta^{13}\text{CH}_4$ und $\delta^{13}\text{CO}_2$ ergab folgendes bei den 30°C - Inkubationen:

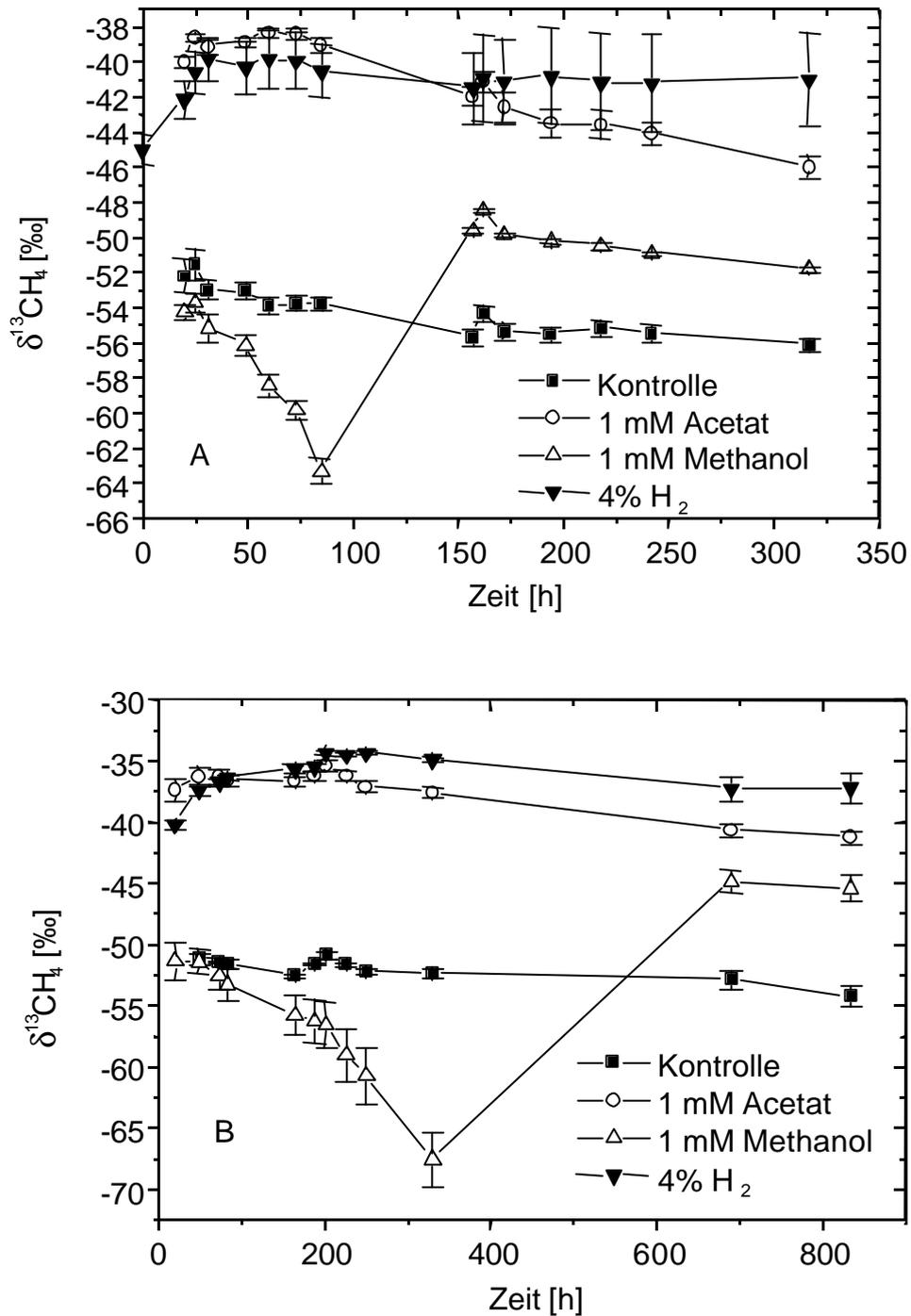


Abbildung 25: $\delta^{13}\text{CH}_4$ [‰] in Sedimentaufschlämungen mit Profundensediment aus Lake Kinneret aus 0 - 3 cm Tiefe vom 03.08.1999 inkubiert bei 30°C (A) bzw. 15°C (B). Zugabe von 1 mM Acetat, 1 mM Methanol und 4% H₂. Daten zeigen jeweils Mittelwerte von 3 parallelen Ansätzen \pm Standardfehler

Die Zugabe von Acetat führte zu einer sofortigen Erhöhung von $\delta^{13}\text{CH}_4$ auf -40‰ im Vergleich zu der Kontrolle von -52‰ (Abbildung 25 A). Innerhalb der Inkubationszeit von 336 h nahm $\delta^{13}\text{CH}_4$ dann um 7‰ auf -46‰ ab. Im Gegensatz dazu blieb der $\delta^{13}\text{CH}_4$ -Wert der Ansätze mit Wasserstoff als Substrat konstant bei -41‰ . Wurde Methanol dazugegeben, dann sank $\delta^{13}\text{CH}_4$ in den ersten 75 h von -54‰ auf -64‰ und stieg darauf im Zeitraum bis 160 h auf -50‰ . Danach nahm der Wert auf -53‰ ab. Wurde dieses Experiment bei 15°C durchgeführt, zeigte sich im Vergleich zu den 30°C - Inkubationen kein großer Unterschied im Kurvenverlauf bis auf den zeitlichen Ablauf (Abbildung 25 B). Die Abnahme von $\delta^{13}\text{CH}_4$ in den Ansätzen mit Methanol dauerte bei 15°C nahezu die vierfache Zeit im Vergleich zu den Inkubationen bei 30°C . Auch waren die $\delta^{13}\text{CH}_4$ -Werte der Ansätze mit Acetat und H_2 als Substrat weniger negativ als bei denen der 30°C -Ansätze.

Bei den $\delta^{13}\text{CO}_2$ -Werten zeigte sich hingegen nahezu kein Unterschied zwischen den Kontrollansätzen und den Ansätzen mit zugegebenem Methanol (Abbildung 26 A). Eine deutliche Abnahme von $\delta^{13}\text{CO}_2$ ist in den Ansätzen mit zugegebenem Acetat beobachtet worden. In den Ansätzen mit Wasserstoff als Substrat ist ein kontinuierlicher Anstieg von $\delta^{13}\text{CO}_2$ auf $+16\text{‰}$ beobachtet worden. Die $\delta^{13}\text{CO}_2$ -Werte der 15°C -Inkubationen stimmten mit denen der 30°C -Inkubationen bis auf den auf die Dauer überein (Abbildung 26 B).

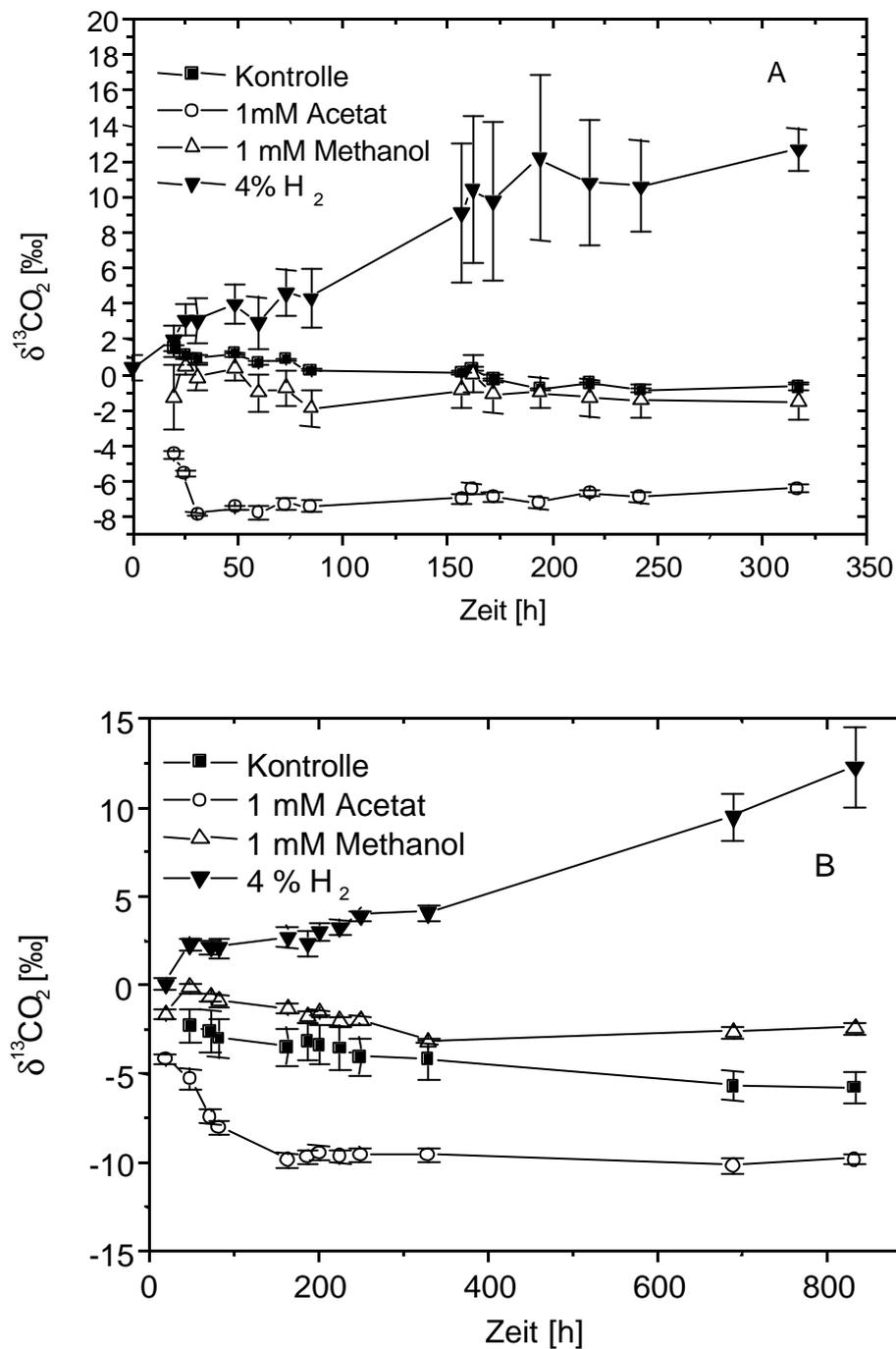


Abbildung 26: $\delta^{13}\text{CO}_2$ [‰] in Sedimentaufschlammungen mit Profundsediment aus Lake Kinneret aus 0 - 3 cm Tiefe vom 03.08.1999 inkubiert bei 30°C (A) und 15°C (B). Zugabe von 1 mM Acetat, 1 mM Methanol und 4% H₂. Daten sind jeweils Mittelwerte von 3 parallelen Ansätzen \pm Standardfehler

4 Diskussion

4.1 Methanproduktion im Plußsee: Jahreszeitlicher Verlauf, Methanzzyklus und Prozesse, die die Methanproduktion beeinflussen

In Anlehnung an die Diskussion aus dem Manuskript: "Methane production in eutrophic Lake Plußsee: seasonal change, temperature effect and metabolic processes in the profundal sediment" sollen hier die wichtigsten Punkte dargestellt werden.

Eine Erhöhung der Inkubationstemperatur von 4°C auf 25°C führte zu einer Stimulierung der Methanproduktion, wie sie auch in anderen Seen beobachtet wurde (Zeikus und Winfrey 1976, Schulz et al. 1997, Nozhevnikova et al. 1997). Die Zunahme der CH₄-Produktionsraten innerhalb des beobachteten Jahres lassen sich höchstwahrscheinlich durch einen erhöhten Eintrag an Biomasse und somit eine Erhöhung des verfügbaren organischen Kohlenstoffes erklären (s. Anhang: Chemische und physikalische Daten des Plußsees). Da die *in situ*-Temperatur während des ganzen beobachteten Zeitraumes nur innerhalb des Bereiches von 4,0°C bis 4,5°C lag, kann ein Einfluss der Temperatur auf die Methanproduktion im Profundalsediment ausgeschlossen werden.

Im Vergleich zu anderen eutrophen Seen war die Methanproduktionsrate des Plußsees mit 1,2 nmol cm⁻³ Sediment niedrig, aber dennoch höher als in oligotrophen und mesotrophen Seen (s. Diskussion Anhang).

An den CH₄-Konzentrationsprofilen in der Wassersäule kann man sehen, dass das CH₄ an der Oxykline oxidiert wurde, wie es auch in anderen Seen beobachtet wurde (Rudd und Taylor 1980). Deutlich ist auch zu erkennen, dass die zu verschiedenen Zeitpunkten gemessenen unterschiedlichen CH₄-Produktionsraten im Sediment zu einer unterschiedlichen CH₄-Konzentration in der Wassersäule führten. Da aber die Menge an akkumuliertem Methan im Hypolimnion mit 250 µmol cm⁻² größer war als die Menge an produziertem Methan im Sediment in den oberen 10 cm, kann man annehmen, dass die CH₄-produzierende Schicht im Sediment tiefer als 10 cm war.

Die Berechnung der Verweilzeit (τ) von CH₄ in der Wassersäule ergab außerdem, dass CH₄ in der Zeit der Stratifikation von August bis September eine Verweilzeit von 300 bis 3000 Tagen hatte, welche für einen See dieser Größenordnung typisch ist (Imboden 1990). Dies

bedeutet, dass das Methan theoretisch 1 bis 10 Jahre benötigen würde, um vom Hypolimnion bis zur Wasseroberfläche zu gelangen. Somit besteht eine weitere Erklärungsmöglichkeit, warum die akkumulierte Methanmenge in der Wassersäule größer war als der theoretische berechnete Wert. Im Gegensatz dazu war der effektive Fluss des Methans mit einem Diffusionskoeffizienten von 0,01 bis 0,10 $\text{cm}^2 \text{s}^{-2}$ höher, als es die Verweilzeit erklären würde. Dieser Diffusionskoeffizient war zwar um das Drei- bis Vierfache größer als der molekulare Diffusionskoeffizient des Methans in Wasser ($0,95 \times 10^{-5} \text{cm}^2 \text{s}^{-1}$), lag aber in dem gleichen Bereich wie der Wärmediffusionskoeffizient in der Wassersäule des Plußsees mit $0,014 \text{cm}^2 \text{s}^{-1}$ (Overbeck und Chrost 1994).

Wie im Anhang: Diskussion beschrieben, war aufgrund der berechneten ΔG -Werte eine Methanogenese aus Acetat thermodynamisch möglich. Anhand der Umsetzung von $[2\text{-}^{14}\text{C}]\text{Acetat}$ zu CH_4 konnte auch gezeigt werden, dass die acetoklastische Methanogenese sowohl bei 4°C als auch bei 25°C stattfinden konnte. Da die auf dem Acetatumsatz basierenden Methanproduktionsraten nur 4 - 5% der Gesamtmethanproduktionsraten ausmachten, bestand die Möglichkeit, dass einerseits neben Acetat noch andere wichtige Substrate für die Methanogenen vorhanden sein müssen oder dass nur ein Teil der acetoklastischen Methanogenese erfasst wurde. Eine Erklärung dafür kann sein, dass in sogenannten Mikronischen höhere Acetatkonzentrationen vorlagen, die von den Methanogenen direkt verwertet werden konnten. Durch diese Mikronischen konnte es aber nicht zu einer Equilibrierung mit dem $[2\text{-}^{14}\text{C}]\text{Acetat}$ kommen, so dass der tatsächliche Umsatz nicht erfasst wurde. Da eine Zugabe von Acetat bei 4°C keine Stimulation der Methanproduktion bewirkte, sondern nur bei 25°C , bestand die Möglichkeit, dass bei der niedrigen Temperatur genügend Acetat für die acetoklastische Methanogenese vorhanden war oder dass das Acetat nicht in diese Mikronischen hineindiffundieren und so den Methanogenen nicht zur Verfügung stehen konnte.

Methanol und Formiat konnten als Substrate der Methanogenen nahezu ausgeschlossen werden. Einerseits waren die Umsatzraten von $[^{14}\text{C}]\text{Methanol}$ bei 25°C und 4°C sehr niedrig, andererseits wurde bei einer Hemmung der Methanogenen kein Methanol akkumuliert. Zugegebenes Methanol stimulierte auch nur bei einer Temperatur von 25°C die Methanbildung, während es bei 4°C eher zu einer Hemmung kam (s. Anhang: Tabelle 7). $[^{14}\text{C}]\text{Formiat}$ wurde bei 25°C und 4°C nur zu $^{14}\text{CO}_2$ umgesetzt, welches dann nur bei 25°C zu $^{14}\text{CH}_4$ weiter umgesetzt wurde, was darauf hindeutete, dass Formiat nicht direkt von Methanogenen verwendet werden konnte.

Außer Acetat ist H_2 in Verbindung mit CO_2 das nächstwichtigste Substrat für die Methanogenen. Bei $25^\circ C$ wurde $[^{14}C]$ Bicarbonat zu $^{14}CH_4$ umgesetzt. Dass bei $25^\circ C$ der Anteil der H_2/CO_2 -abhängigen Methanbildung ca. 30 - 40 % an der Gesamtmethanbildung beträgt, wurde zusätzlich in den Experimenten gezeigt, in denen der Umsatz von $[1-^{14}C]$ Acetat und $[^{14}C]$ Formiat untersucht worden war. Nachdem nämlich $[1-^{14}C]$ Acetat und $[^{14}C]$ Formiat zu $^{14}CO_2$ umgesetzt worden waren, wurde im nächsten Schritt aus dem $^{14}CO_2$ $^{14}CH_4$ produziert. Bei $4^\circ C$ konnte hingegen die hydrogenotrophe Methanbildung nicht nachgewiesen werden. Eine wahrscheinliche Erklärung dafür kann sein, dass die Menge des gebildeten $^{14}CH_4$ unter dem Detektionslimit des Radioaktivdetektors lag. Unter der Annahme, dass dennoch aus dem $[^{14}C]$ Bicarbonat $^{14}CH_4$ gebildet wurde und diese Menge direkt unterhalb des Detektionslimits lag, wäre der Anteil der H_2/CO_2 -abhängigen Methanogenese bei $4^\circ C$ 15 %, was deutlich unterhalb des Anteils bei $30^\circ C$ liegt. Andererseits kann es aber auch sein, dass der Wasserstoff im Sediment für die Methanogenese der limitierende Faktor war. Eine Zugabe von Wasserstoff führte nämlich zu einer Stimulation der Methanbildung. Ob dieses durch die Stimulierung zusätzlich gebildete Methan direkt aus dem zugegebenen Wasserstoff gebildet wurde, kann nicht definitiv gesagt werden. So ist die Möglichkeit wahrscheinlich, dass der Wasserstoff durch homoacetogene Bakterien zuerst zu Acetat umgesetzt wurde, welches dann von acetoklastischen Methanogenen verwendet wurde. Die Annahme, dass unter psychrophilen Bedingungen die Homoacetogenen gegenüber den hydrogenotrophen Methanogenen bei der Konkurrenz um Wasserstoff im Vorteil sind, wurde sowohl thermodynamisch mit Rein- und Anreicherungskulturen (Conrad und Wetter 1990, Kotsyurbenko et al. 1993) als auch direkt in anaeroben Habitaten (Shannon und White 1996) bestätigt. Dagegen sind bei höheren Temperaturen die Methanogenen gegenüber den Homoacetogenen bei der Konkurrenz um Wasserstoff im Vorteil (Cord-Ruwisch et al. 1988). Durch die Zugabe von Glucose und Pectin konnte weiter gezeigt werden, dass das Hauptfermentationsprodukt aus diesen Substanzen Acetat war, bevor dieses zu CH_4 und CO_2 umgesetzt wurde. Dass Pectin vornehmlich zu Methanol abgebaut wurde, wie es in einem anderen See beobachtet wurde (Schink und Zeikus 1982), konnte im Plußsee nicht nachgewiesen werden. Wegen der Lage des Plußsees innerhalb eines Waldes und des starken Bewuchses des Ufers mit Pflanzen kann angenommen werden, dass eine stetiger Eintrag von pflanzlicher Biomasse in den See erfolgt. Das hierbei eingebrachte Pectin kann somit als ein Hauptsubstrat für die Acetatfermentation angenommen werden.

Die Bestimmung von $\delta^{13}CH_4$ und $\delta^{13}CO_2$ ergab, dass bei einer Inkubation bei $25^\circ C$ $\delta^{13}CH_4$ negativer war als bei einer Inkubation bei $4^\circ C$, was als ein weiterer Hinweis verstanden

werden kann, dass bei der *in situ* Temperatur von 4°C die acetoklastische Methanogenese dominiert, während bei der höheren Temperatur zusätzlich noch die H₂/CO₂-abhängige Methanogenese an der Gesamtmethanbildung beteiligt ist.

Dies ließ sich dadurch noch bestärken, dass bei der Hemmung mit CH₃F bei 25°C die Methanproduktion nur teilweise gehemmt war, was bedeutet, dass ein Teil des Methans aus H₂/CO₂ produziert worden sein musste. Bei 4°C lag jedoch die Acetatbildungsrate unter dem Detektionslimit, was bedeutet, dass sich eine mögliche Acetatakkumulation bei einer Hemmung bei 4°C nicht nachweisen ließ.

Die hier aufgeführten Experimente haben gezeigt, dass im Profundalsediment des Plußsees die Prozesse, die in die Methanproduktion involviert sind, durch die Inkubationstemperatur beeinflusst wurden.

Bei 25°C wird das Methan sowohl aus Acetat als auch aus H₂/CO₂ gebildet. Da der Anteil des H₂/CO₂ an der gesamten Methanbildung 30 - 40 % beträgt, wird angenommen, dass der andere Teil durch acetoklastische Methanogenese produziert wird. Durch die Hemmung der acetoklastischen Methanogenese konnte dieser Befund bekräftigt werden.

Bei 4°C hingegen kann auf Grund der durchgeführten Experimente nur Acetat als das wichtigste Substrat angenommen werden. Wasserstoff scheint nur im verminderten Maße direkt von den Methanogenen verwendet worden zu sein. Die Wahrscheinlicher ist, dass die Homoacetogenen in der Nutzung des Acetats gegenüber den Methanogenen im Vorteil sind.

Durch die Zugabe von Glukose und Pectin konnte sowohl für 25°C als auch 4°C gezeigt werden, dass der Abbauweg der Fermentation von Monomeren über Acetat erfolgt.

4.2 Methanproduktion im Lake Kinneret

4.2.1 Einfluss der Temperatur auf die Methanbildung

Wie auch schon im Plußsee beobachtet, verursachte eine höhere Inkubationstemperatur als die *in situ* Temperatur eine Stimulierung der Methanbildung. Dieser Temperatureinfluss zeigte sich nicht nur, wenn Mischsediment aus einer Tiefe von 0-15 cm des Profundalsedimentes untersucht wurde, sondern auch wenn die einzelnen Schichten in getrennten Sedimentaufschlämmungen untersucht worden waren (Tabelle 3 und Tabelle 4). Ein Einfluss der Jahreszeit auf die Methanbildung konnte nicht gezeigt werden. Lake Kinneret hat keinen stetigen externen Eintrag von Biomasse wie der Plußsee, so dass eine zeitliche Abhängigkeit der Nährstoffversorgung durch äußere Faktoren ausgeschlossen werden kann. Durch die jährliche Algenblüte des Dinoflagellaten *Peridinium gatunense* zwischen Februar und Mai

kommt es im Hypolimnion bei Sommerbeginn mit beginnender Stratifikation zu einem Eintrag an organischer Biomasse, wenn der Dinoflagellat abstirbt (Gophen und Nishri, 1994). Diese Algenblüte findet jedes Jahr in unterschiedlich starkem Maße statt, so dass der Eintrag an organischem C variiert. Die CH₄-Produktionsraten waren 1999 leicht höher als im Jahr 1998 (Tabelle 3), obwohl die Algenblüte 1999 schwächer ausfiel als 1998, womit auch hier ein direkter Einfluss auf die Methanogenese nicht bekräftigt werden konnte. Durch den erniedrigten Wasserpegel und den geringeren Wasserzulauf im Jahr 1999 begann die Stratifikation im See schon Ende April, während sie 1998 erst im Mai/Juni begann. Die CH₄-Produktionsraten des Profundalsedimentes bei *in situ* Temperatur lagen mit 0,11 - 0,77 nmol h⁻¹ cm⁻³ Sediment in einem ähnlichen Bereich, wie sie in anderen mesotrophen Seen, wie Lake Washington (< 0,17 nmol h⁻¹ cm⁻³; Kuivila et al. 1988) und Lake Kizaki (0,28 - 1,9 nmol h⁻¹ cm⁻³; Takii et al. 1997), gemessen wurden. Bei einer Inkubation der einzelnen Schichten bei 15°C und 30°C zeigte sich aber, dass die CH₄-Produktionsraten zu diesem Zeitpunkt der Probennahme höher waren als die Rate im Mischsediment. Mit 13,8 nmol h⁻¹ cm⁻³ Sediment bei 30°C bzw. 3,3 nmol h⁻¹ cm⁻³ Sediment bei 15°C in der Schicht 0 - 1 cm waren die CH₄-Produktionsraten um das 4 bis 5 -fache größer als im Mischsediment. Diese Werte waren mit den CH₄-Produktionsraten von ca. 7,1 nmol h⁻¹ cm⁻³ Sediment vergleichbar, die in der Littoralzone des subtropischen Lake Okeechobe gemessen wurden (Drake et al. 1996). Die niedrigere Rate im Mischsediment lässt sich dadurch erklären, dass die CH₄-Produktionsraten mit der Tiefe abnahmen und bis zu 10-fach kleiner waren als an der Oberfläche (Tabelle 4). Dieser Befund ergab sich sowohl bei 15°C als auch bei 30°C. Während der Temperatureffekt auf die Methanbildung im Profundalsediment deutlich zu sehen war, waren die Unterschiede bei den Sedimenten der Stationen F und S geringer. Eine Erklärung dafür können die stärkeren Temperaturschwankungen sein, die bei Station F und S bis zu 10°C am Tag ausmachen können. Auch waren die mittleren Temperaturen des Wassers über dem Sediment höher als bei Station A (Eckert et al. 2000). Die Bakterienpopulationen könnten so besser an eine schnelle Erhöhung oder Erniedrigung der Temperatur angepasst sein, oder die optimale Temperatur für das Wachstum der Mikroorganismen lag von vornherein zwischen 15°C und 30°C.

Eine Erhöhung der Inkubationstemperatur der Sedimentaufschlammungen mit Profundalsediment von Station A führte zu einem Ansteigen der CO₂- bzw. H₂-Konzentrationen (Abbildungen 5 B und C). Der Anstieg der CO₂-Konzentrationen kann durch eine abnehmende Löslichkeit der Gase mit zunehmender Temperatur erklärt werden. Dagegen können die höheren H₂-Konzentrationen durch eine stärkere Fermentation, die

durch die höhere Inkubationstemperatur verursacht wurde, erklärt werden. Im Vergleich zu Bodenaufschlammungen mit Reisfeldboden, wo der Anstieg und die Abnahme der H_2 -Konzentrationen innerhalb 50 h stattfand (Chin 1996), erstreckte sich der Anstieg und die Abnahme der H_2 -Konzentrationen im Profundalsediment des Lake Kinneret über einen Zeitraum von ca. 100 h, was im vergleichbaren Bereich lag.

Um dieses Kapitel abzuschließen, kann man sagen, dass, obwohl ganzjährig eine *in situ* Temperatur von 15°C bis 17°C im Profundal vorherrscht, der Optimalbereich der methanogenen Prozesse oberhalb dieser Temperatur liegt. Eine Erhöhung der Inkubationstemperatur resultierte in einer Veränderung der Methanbildung, aber auch in einer Veränderung der H_2/CO_2 -Konzentrationen.

4.2.2 Hemmung der Methanogenen

Zur Bestimmung der Stoffwechselwege, die im direkten Bezug zu der CH_4 -Produktion im Profundalsediment des Lake Kinneret stehen, wurden Hemmversuche durchgeführt. Hierbei wurden Hinweise auf eine Temperaturabhängigkeit dieser Prozesse gefunden. Wurden die Sedimentaufschlammungen bei 30°C gehemmt, war bei allen verwendeten Hemmstoffen eine Hemmung der Methanogenese und eine Akkumulation von Acetat festgestellt worden. Während nun aber beim Bilanzieren nur in den Ansätzen mit Chloroform die Menge des akkumulierten Acetats mit der in den Kontrollen produzierten Menge CH_4 vergleichbar war, waren die Menge an akkumuliertem Acetat bei der Verwendung von BES und CH_3F als Hemmstoff größer als die erwartete Menge an CH_4 . Dies legt nahe, dass es außer der Methanbildung noch andere Acetat-verbrauchende Prozesse im Profundalsediment gab, die sich durch die Zugabe von BES und CH_3F hemmen ließen. Das Besondere dabei ist, dass sich diese Prozesse durch die Zugabe von $CHCl_3$ nicht hemmen ließen. Eine weitere Möglichkeit kann aber auch sein, dass die zugegebene Konzentration von $CHCl_3$ nicht ausreichend hoch war, um neben den Methanogenen auch die anderen Mikroorganismen zu hemmen, die Acetat anaerob verwerten können. Von der anderen Seite aus betrachtet bestand auch die Möglichkeit, dass $CHCl_3$ auch die Homoacetogenese hemmte, was zu einer verminderten Acetatproduktion führte. BES und CH_3F hingegen können nicht die Homoacetogenen hemmen, womit diese den durch die Hemmung der hydrogenotrophen Methanogenen akkumulierenden Wasserstoff sofort zu Acetat umsetzen können, was zu einer höheren Acetatkonzentration im Sediment als der theoretisch berechnete Wert führte.

Der andere verwendete Hemmstoff Methylfluorid ist ein spezifischer Hemmstoff der acetoklastischen Methanogenese (Frenzel und Bosse 1996, Janssen und Frenzel 1997,

Conrad und Klose 1999). In höheren Konzentrationen kann CH_3F jedoch auch die H_2/CO_2 -abhängige Methanogenese hemmen (Conrad und Klose 1999). In Vorversuchen wurde festgestellt, dass CH_3F erst ab einer zugegeben Konzentration von 3,5 % (v/v) eine eindeutige Hemmung der acetoklastischen Methanogenese im Profundalsediment des Lake Kinneret verursachte. Zum Vergleich dazu ist im Reisfeldboden eine Konzentration von 0,5 - 1 % (v/v) ausreichend (Conrad und Klose 1999). Da im Vergleich zu den Kontrollansätzen 75 - 80 % der gesamten Methanbildung gehemmt war, kann nicht ausgeschlossen werden, dass auch die H_2/CO_2 -abhängige Methanogenese teilweise gehemmt worden war. Die Experimente mit [^{14}C]Bicarbonat haben nämlich einen Anteil von ca. 45% der H_2/CO_2 -abhängigen Methanogenese an der Gesamtmethanbildung ergeben. Es kam nun sowohl bei 15°C (Daten nicht gezeigt) als auch bei 30°C zu einer Inhibition der Methanogenese nach Zugabe von 3,5 % CH_3F . Da aber nur bei den 30°C-Inkubationen Acetat akkumuliert wurde - und dieses in Bezug zur Endbilanz zuviel -, konnte vermutet werden, dass die acetogenen Stoffwechselwege auch einer Temperaturlimitierung unterlagen. Da auch die Zugabe von BES bei 30°C zu einer stöchiometrisch höheren Akkumulation von Acetat führte, als es erwartet war, bestand die zusätzliche Möglichkeit, dass auch BES in der eingesetzten Konzentration von 25 mM noch andere Mikroorganismen außer den Methanogenen hemmte. Bei 15°C zeigte eine Zugabe von BES nur eine schwache Hemmung der Methanproduktion (Abbildung 13 A). Eine Erklärung dafür kann sein, dass entweder das BES abgebaut wurde, was durch die Anreicherung von Brom im Porenwasser hätte bewiesen werden können, oder bei dieser Temperatur keinen Hemmeffekt hatte. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden jedoch keine weiteren Versuche durchgeführt. 15°C ist im Profundalsediment die *in situ* Temperatur, was hypothetisch bedeuten kann, dass die BES-abbauenden Mikroorganismen besser an diese Temperatur adaptiert waren und somit nach Zugabe des BES ohne eine lag-Phase mit dem Abbau beginnen können. Eine Inkubation bei 30°C könnte dann im Gegensatz dazu bedeuten, dass diese Temperatur außerhalb des optimalen Bereiches für die BES-abbauenden Organismen gelegen hätte.

Die nächste Fragestellung war nun, welche anderen anaeroben Abbauwege von Acetat außer der Methanogenese noch möglich sein könnten. Als ein wichtiger möglicher Stoffwechselweg ist hierbei die Sulfatreduktion zu nennen. Diese wurde und wird kontinuierlich auch in den oberen Schichten des Profundalsedimentes des Lake Kinneret untersucht (Hadas und Pinkas 1992, 1995 a und 1995 b). Es wurde hierbei festgestellt, dass die Sulfatreduktion stark abhängig von der Verfügbarkeit der Biomasse war, die im Hypolimnion sedimentierte. Diese

Sedimentationsraten sind jahreszeitlich unterschiedlich, womit auch die Sulfatreduktionsraten sich innerhalb eines Jahres unterscheiden. Die direkt beobachtete Sulfatreduktion findet nur in den oberen 0 - 2,5 cm des Profundalsedimentes statt. Eine Limitierung der Sulfatreduktion durch die vorhandene SO_4^{2-} -Konzentration konnte nicht beobachtet werden. Die Sulfatreduktion wurde hierbei immer in frischem ungelagertem Sediment untersucht. Das Sediment, welches in den aufgeführten Versuchen zur Untersuchung der Methanogenese verwendet wurde, wurde mindestens 7 - 14 d zuerst bei 15°C, dann bei 4°C gelagert. Damit konnte sichergestellt werden, dass noch im Sediment vorhandenes Sulfat reduziert worden war, unter der Annahme einer Sulfatreduktionsrate von $1000 \text{ nmol cm}^{-3} \text{ d}^{-1}$. Diese Rate wurde in den oberen 2 cm des Profundalsedimentes bei Station A im Mai und Juni als Durchschnittswert gemessen (Hadas und Pinkas 1992, 1995 a und 1995 b). Im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Analysen von Porenwasser aus den verschiedenen Schichten des Profundalsedimentes ergaben, dass die Sulfatkonzentrationen bis auf die Schicht in 4 cm Tiefe alle unter 100 μM lagen. Nur in 4 cm Tiefe war eine Konzentration von 400 μM gemessen worden. Ab einer Tiefe von 8 cm konnte kein gelöstes Sulfat mehr nachgewiesen werden. Konzentrationen von 100 μM sind noch für eine Sulfatreduktion in Süßwasser-Sedimenten ausreichend (Smith und Klug 1981, Ingvorsen et al. 1981). Da aber vor dem Beginn der Experimente die Sedimentaufschlammungen mindestens 1 h bei 25°C vorinkubiert wurden und die Gasphase danach noch einmal ausgetauscht wurde und die CH_4 -Produktion sofort danach einsetzte, kann angenommen werden, dass das in den Sedimentaufschlammungen noch vorhandene Sulfat reduziert worden war. Überprüfungen zu dieser Annahme wurden jedoch nicht durchgeführt. Darauf deutet hin, dass im Porenwasser, das direkt nach dem zweiten Begasen genommen worden war, kein Sulfat mehr nachgewiesen worden war. Die Tatsache, dass man nach der Vorinkubation in der Gasphase H_2S olfaktorisch detektieren konnte, ist ein weiterer Hinweis darauf, dass vorhandenes Sulfat soweit zu H_2S reduziert worden war, dass die Methanogenen in der Konkurrenz um die Substrate gegenüber den Sulfatreduzierern im Vorteil waren. In Vorversuchen wurde außerdem festgestellt, dass ohne den zweiten Austausch der Gasphase die Methanbildung nur verzögert einsetzte. Dies kann eventuell von einer hemmenden Wirkung des durch die Sulfatreduktion gebildeten H_2S in der Gasphase auf die Methanogenen herkommen. Dass H_2S in höheren Konzentrationen die Methanbildung hemmen kann, wurde schon dokumentiert (Zaid et al. 1986). Ein anderer Gesichtspunkt könnte sein, dass trotz anwesendem Sulfat die Methanogenen in der Konkurrenz mit den Sulfatreduzierern um das im Sediment vorhandene Acetat stärker waren. Acetat muss auch nicht als Elektronendonator für die

sulfatreduzierenden Mikroorganismen dienen, da z.B. im Sediment des Lake Mendota herausgefunden wurde, dass Wasserstoff die Sulfatreduktion stimulierte, wohingegen Acetat keinen stimulierenden Effekt zeigte (Ingvorsen et al. 1981).

Analysen des Porenwassers auf Nitrat, Mangan und Eisen ergaben, dass Nitrat und Mangan unterhalb des Detektionslimits waren und nur 6 - 8 μM Eisen(III) im Profundalsediment vorhanden waren, so dass eine Nitratreduktion, Manganreduktion und eine Eisenreduktion nicht nachgewiesen werden konnte.

Ein weiterer möglicher Abbauweg des Acetats ist der syntrophe Acetatabbau zu H_2/CO_2 und der danach folgenden hydrogenotrophen Methanbildung (s. Tabelle 2, Gleichung 4 und 1). Diese nicht-acetoklastische Methanbildung wurde schon von Barker (1936) angenommen. Experimentell wurde sie unter leicht thermophilen Bedingungen (Zinder und Koch 1984) und unter mesophilen Bedingungen (Schnürer et al. 1996) bestätigt. Unter thermophilen Bedingungen wuchs ein *Methanobacterium spec.* mit einem Acetatoxidierer in Mischkultur, wobei der Acetatoxidierer das zugegebene Acetat zu H_2/CO_2 oxidierte und dieses von den Methanogenen zu CH_4 umgesetzt wurde. Der mesotrophe Abbauweg wurde in einer Kultur aus drei Organismen beobachtet, die bei $\text{pH} 6$ (ummonriukozmentratioeon und einm pCH) Tj4505.75 0 T

Profundalsediment von Lake Mendota mit 0,22 h gemessen (Winfrey und Zeikus 1979). Ein Grund für die längere Umsatzzeit von Acetat im Profundalsediment von Lake Kinneret im Vergleich zu Lake Mendota kann sein, dass er oligo- bis mesotroph ist, wo hingegen Lake Mendota stark eutroph ist. Somit waren auch die Acetatkonzentrationen im Sediment im Lake Kinneret viel geringer als im Lake Mendota.

Acetat wurde im Profundalsediment von Lake Kinneret, verglichen mit Glucose, schneller umgesetzt (Toerien und Cavari 1982). Dies lässt sich damit erklären, dass unter anaeroben Bedingungen die Glucose in mehreren Schritten zu den für Methanogene verfügbaren Fettsäuren bzw. Wasserstoff abgebaut werden muss. Acetat kann hingegen ohne weitere Zwischenschritte zu Methan bzw. Kohlendioxid umgesetzt werden.

Innerhalb des Profundalsedimentes ließ sich eine tiefenabhängige Acetatumsetzung feststellen (Tabellen 7.1 bis 7.4). Die Abnahme der Acetatumsatzraten (V_{ac}) mit zunehmender Tiefe im Sediment war durch die nach unten abnehmenden Acetatkonzentrationen bedingt. Die hohen RI-Werte lieferten einen weiteren Hinweis, dass das Acetat außer von den Methanogenen noch von anderen anaeroben Organismen verwertet wurde. Wird [2- ^{14}C]Acetat von Methanogenen zu $^{14}CH_4$ und $^{14}CO_2$ umgesetzt, erhält man einen RI-Wert von 0,2 (Winfrey und Zeikus 1979 a und b, Lovley und Klug 1982, Conrad und Schütz 1988). Hierbei wird, obwohl nur die Methylgruppe mit ^{14}C markiert wurde, neben $^{14}CH_4$ auch ein geringer Anteil $^{14}CO_2$ produziert, was sich durch einen natürlichen Isotopenaustausch zwischen der Methyl- und der Carboxylgruppe erklären lässt. Dieser Isotopenaustausch wurde sowohl bei Verwendung von Acetat als auch von Formiat als Substrat beobachtet (de Graaf et al. 1996, de Graaf und Cappenberg 1996). Gibt es außer den methanogenen Prozessen noch oxidative Prozesse wie Sulfatreduktion oder Eisen(III)-Reduktion, wird ein größerer Anteil der markierten Methylgruppe zu $^{14}CO_2$ umgesetzt, was eine Erhöhung des RI-Wertes verursacht. So bedeutet ein RI-Wert von 1, dass das Acetat rein oxidativ gespalten wurde. Bei den Experimenten mit [2- ^{14}C]Acetat mit Profundalsediment vom Lake Kinneret waren in den Schichten von 2 bis 20 cm sowohl bei 15°C als auch bei 30°C die RI-Werte größer als 0,2 (Tabelle 7.1 bis 7.4). Wurden die Experimente bei 15°C durchgeführt, waren die RI-Werte größer als bei 30°C, was darauf hindeutet, dass bei der niedrigeren Temperatur der Anteil der oxidativen Acetatverwertung zunahm. Nur in der obersten Schicht (0 - 1 cm) lag der RI-Wert bei 30°C 0,15 bzw. 0,25 bei 15°C, was bedeutet, dass bei beiden Inkubationstemperaturen das zugegebene Acetat überwiegend reduktiv von den Methanogenen verwertet worden war. Auch stimmten hier die acetoklastischen CH_4 -Produktionsraten (P_{ac}) mit den Gesamtmethan-Produktionsraten nahezu überein, so dass in

der obersten Schicht davon ausgegangen werden kann, dass die acetoklastischen Methanogenen bei der Konkurrenz um Acetat gegenüber anderen Acetatverwertern klar im Vorteil waren. Dafür sprechen auch die mit Abstand höchsten CH_4 -Produktionsraten bei 30°C und 15°C .

In den Sedimentschichten unterhalb 1 cm Tiefe jedoch wurde das Acetat schon gemischt reduktiv-oxidativ gespalten. Das Besondere daran war nun aber, dass aufgrund der berechneten acetoklastischen CH_4 -Produktionsraten mehr CH_4 hätte produziert werden müssen, als es tatsächlich der Fall war. Eine Erklärung dafür könnte sein, dass hierbei trotz des Einrechnens des RI-Wertes in die acetoklastische CH_4 -Produktionsrate (P_{ac}) auf Grund dieser Berechnungen einerseits eine Unterschätzung der oxidativen Prozesse oder andererseits eine Überschätzung der acetoklastischen Methanogenese daraus gefolgert wurde. So besteht die Möglichkeit, dass bei der Bestimmung des Acetatumsatzes im Sediment nicht die totale Umsatzrate bestimmt wurde, sondern nur eine partielle, da durch die Zugabe von Wasser bei der Herstellung der Sedimentaufschlämmungen eine andere Konsistenz des Sedimentes erreicht wurde, bzw. gebundene Nährstoffe gelöst wurden und so zu einer höheren Umsatzrate führten. Zu beachten ist außerdem, dass der Anteil der H_2/CO_2 -abhängigen Methanogenese, der durch die [^{14}C]Bikarbonatexperimente bestimmt wurde, bei 30°C im Bereich von 40% und bei 15°C im Bereich von 25% lag (Tabelle 10); somit konnte Acetat als alleiniges Substrat für die Methanogenese ausgeschlossen werden.

Eine Überprüfung des Einflusses der Dauer der Vorinkubation auf den RI-Wert ergab, dass bei 30°C nahezu kein Unterschied zwischen den Ansätzen, die nicht vorinkubiert wurden, und den Ansätzen, die bis maximal 14 d lang vorinkubiert wurden, festzustellen war. Bei 15°C nahm jedoch der RI-Wert mit zunehmender Vorinkubationszeit zu. Dies zeigt, dass mit zunehmender Inkubationszeit der Anteil der oxidativen Acetatspaltung an dem gesamten Acetatumsatz zunahm. Da aber bei den Ansätzen, die bei 30°C inkubiert worden waren, die RI-Werte in dem beobachteten Zeitraum nicht zunahmten, kann ein Eindringen von Sauerstoff in die Kulturröhrchen bei einer Inkubation bei 15°C ebenfalls ausgeschlossen werden. Möglicherweise ist der gesamte Acetatumsatz aufgrund der sehr niedrigen Acetatkonzentrationen im Sediment (sie lagen unterhalb des Detektionslimits) verlangsamt. Die Methanogenen könnten somit gegenüber den syntrophen Acetatverwertern bei der Konkurrenz um Acetat im Nachteil sein. Wenn nun genügend Acetat vorhanden war, lag der RI-Wert unterhalb von 0,2, wie es bei dem Versuch mit der Zugabe von Acetat und der anschließenden Bestimmung des RI-Wertes gezeigt wurde (Tabelle 9). Der während des Experimentes abnehmende RI-Wert kann durch mehrere Hypothesen erklärt werden.

Einerseits kann die Populationsgröße der acetoklastischen Methanogenen durch die Zugabe von Acetat gegenüber den Populationen der anderen Methanogenen angewachsen sein. Andererseits besteht dennoch die Möglichkeit, dass, obwohl kein Sulfat mehr detektiert werden konnte, dennoch Sulfatreduktion, wenn auch nur im vermindertem Maße in den Sedimentaufschlammungen stattfand. Diese Sulfatreduktion würde nun in direkter Konkurrenz zur Methanogenese stehen. Wenn nun genügend Acetat durch die Zugabe im Sediment vorhanden war, kann dies bedeuten, dass die Methanogenen in der Konkurrenz um das Acetat im Vorteil waren, was dazu führte, dass das Acetat ausschließlich reaktiv verwertet wurde. Die Beobachtung, dass in der obersten Schicht des Profundalsedimentes, die eine Acetatkonzentration von 55 μM im Porenwasser hatte, ein RI-Wert von 0,2 berechnet wurde, bekräftigt diese Annahme.

Wie schon angesprochen, wurde ein Teil des Methans im Profundalsediment aus H_2/CO_2 produziert. Bei 30°C war der Anteil der hydrogenotrophen Methanogenese mit durchschnittlich 45 % deutlich größer als mit 25 % bei 15°C. Diese Temperaturabhängigkeit der H_2/CO_2 -abhängigen Methanogenese wurde auch im Bodensee (Schulz und Conrad 1996) und im Plußsee beobachtet. Im Gegensatz zu diesen Beobachtungen wurde jedoch in anderen Seen und Feuchtgebieten ein viel höherer Anteil der H_2/CO_2 -abhängigen Methanogenese an der Gesamtmethanogenese beobachtet; er reichte von 50 % bis zu 100 % (Jones et al. 1982, Galchenko 1994, Namsarev et al. 1995). Diese unterschiedlichen Beobachtungen wurden damit erklärt, dass der Anteil der hydrogenotrophen Methanogenese von den im Sediment vorliegenden H_2 -Konzentrationen abhängig sei. Da im Profundalsediment des Lake Kinneret bei 30°C die H_2 -Konzentrationen mit ca. 2 Pa größer waren als mit 0,5 Pa bei 15°C (Abbildung 5 C), trifft diese Behauptung auf den Lake Kinneret zu.

Conrad (1999) zeigte, dass die hydrogenotrophe Methanogenese erst ab einem ΔG -Wert von -23 kJ / mol Reaktion energetisch möglich ist. So ist bei einer Inkubationstemperatur von 15°C die hydrogenotrophe Methanogenese im Profundalsediment des Lake Kinneret thermodynamisch möglich (Tabelle 6). Bei einer Inkubationstemperatur von 30°C war die hydrogenotrophe Methanogenese jedoch theoretisch nicht möglich, da mit -13,8 kJ / mol noch nicht der genannte Schwellenwert erreicht wurde. Dass bei weniger exergonen ΔG -Werten dennoch hydrogenotrophe Methanogenese möglich ist, wurde in Hafen- und Kanalbeckensedimenten (Westermann, 1994) gezeigt. Im Lake Kinneret wurde bei 30°C jedoch hydrogenotrophe Methanogenese mit einem Anteil von 45 % an der gesamten Methanbildung bestimmt. Dies bedeutet, dass trotz des weniger exergonen ΔG -Wertes die

hydrogenotrophe Methanbildung stattgefunden hat. Eine Erklärung für diese Beobachtung wird nun im Folgenden versucht.

Es wird angenommen, dass unter normalen Bedingungen der Anteil der H_2/CO_2 -abhängigen Methanogenese an der Gesamtmethanogenese sowohl in Böden als auch in Sedimenten um die 33 % liegt (Conrad 1999). Das restliche Methan wird überwiegend durch acetoklastische Methanogenese produziert. Die sehr hohen Produktionsraten der acetoklastischen Methanogenese (P_{ac}) im Profundalsediment des Lake Kinneret standen nun im Kontrast zu dem gemessenen Anteil der H_2/CO_2 -abhängigen Methanogenese. Dieser Anteil machte bis zu 50 % aus (Tabelle 10). Wie man in den Abbildungen 17 A und B sieht, wird dieser Anteil erst nach einer Inkubation von 100 bis 200 h nach Beginn des Experimentes erreicht. Im Gegensatz dazu fand die Umsetzung des Acetats innerhalb von 1 bis 2 h nach seiner Zugabe statt. Eine Erklärung für diesen erst später zunehmenden Anteil der H_2/CO_2 -abhängigen Methanogenese kann die Verarmung des Sedimentes an Acetat sein, was somit einen zwangsläufigen Rückgang der acetoklastischen Methanogenese und eine Zunahme der hydrogenotrophen Methanogenese bedeuten würde. Diese Abnahme des Acetats wurde auch bei dem Hemmversuch mit BES als Hemmstoff beobachtet. Die Acetatkonzentrationen des Porenwassers in den Kontrollansätzen nahmen während des Experimentes soweit ab, dass gegen Ende des Experimentes die Acetatkonzentrationen unter dem Detektionslimit der HPLC von 2 μ M lagen. Die im Sediment vorhandenen Methanogenen müssten sich somit von dem nur in der ersten Inkubationsphase produzierten Acetat als Substrat auf das immer vorhandene CO_2 als Substrat umstellen. Dies kann durch eine Verschiebung der Populationsgrößen von den acetoklastischen Methanogenen hin zu den hydrogenotrophen Methanogenen erfolgen. Der Übergang wäre hierbei fließend. Die andere, plausible Möglichkeit ist der Einfluss des syntrophen Acetatabbaues. Wie beschrieben, wird hierbei Acetat in einem Zwischenschritt durch syntrophe Acetatoxidierer zu CO_2 und H_2 oxidiert. Diese Zwischenprodukte werden dann durch hydrogenotrophe Methanogene zu Methan reduziert. Findet dieser Abbauweg nun im Sediment statt, würde der größere Anteil des Acetats durch die Acetat-Reduktion der Methanogenen verbraucht werden und nur ein geringerer Anteil zusätzlich oxidativ gespalten werden. Somit würde sich dann aber auch der Anteil der H_2/CO_2 -abhängigen Methanogenese durch den zusätzlich produzierten Wasserstoff erhöhen. Diese Acetatspaltung müsste aber in Aggregaten stattfinden, da der frei werdende Wasserstoff direkt von den Methanogenen aufgenommen werden müsste. Die hier bei 30°C gemessenen H_2 -Konzentrationen lagen nämlich unterhalb der für diesen

Stoffwechselweg thermodynamisch notwendigen Konzentrationen. Bei 15°C hingegen waren die H₂-Konzentrationen völlig ausreichend.

Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung wäre ein größerer Anteil der syntrophen Acetatoxidation bei 30°C. Dies würde zu einer stärkeren H₂-Bildung aus Acetat führen, was zu einer Stimulierung der Methanogenese führen würde. Unter der Annahme, dass die syntrophe Acetatoxidation in Mikronischen (Aggregaten) stattfindet, würde dies bedeuten, dass der hierbei freiwerdende Wasserstoff aufgrund der höheren Temperatur sofort zu Methan umgesetzt wird, bevor er an die Umgebung abgegeben werden kann.

Ein weiterer Gesichtspunkt, der auf eine syntrophe Acetatoxidation hindeutet, ist die in anderen Seen gemachte Beobachtung, dass bei zunehmender Sulfatlimitierung Sulfatreduzierer Acetat oxidativ spalten, wobei der entstehende Wasserstoff syntroph von Methanogenen verwendet wurde (Zinder 1994). Da es im verwendeten Sediment auf Grund der längeren Lagerung zu einer Abnahme des Sulfats kam, kann diese Beobachtung als eine zusätzliche Erklärung für die Art des syntrophen Organismus herangezogen werden. Vom thermodynamischen Gesichtspunkt aus ist die syntrophe Acetatoxidation im Lake Kinneret möglich (Tabelle 6). Die Acetatspaltung zu H₂/CO₂ war hierbei strikt exergon. Obwohl die H₂-Partialdrücke in den Sedimentaufschlämmungen unter 2 Pa lagen, war $\Delta G'$ sowohl bei 15°C als auch bei 30°C strikt exergon. In den Experimenten mit Lake Kinneret Sediment sind die H₂-Partialdrücke niedriger als in den mit Reinkulturen durchgeführten Experimenten unter thermophilen Bedingungen, wo H₂-Partialdrücke um die 20 - 30 Pa eingestellt wurden (Lee und Zinder 1988). Es wurde aber schon angenommen, dass bei niedrigeren Temperaturen niedrigere H₂-Partialdrücke für die syntrophe Acetatoxidation notwendig sind (Schink 1997). Dies wurde bei den Versuchen mit dem mesophilen Acetatoxidierer *Clostridium ultuense* gezeigt, in deren Verlauf nur Wasserstoffpartialdrücke zwischen 2 und 7 Pa gemessen wurden (Schnürer et al. 1997).

Die Experimente mit [2-¹⁴C]Acetat und [¹⁴C]Bikarbonat mit den Sedimenten der Stationen F und S ergaben ein ähnliches Bild wie beim Profundalsediment der Station A. Auch hier war die acetoklastische CH₄-Bildungsrate (P_{ac}) größer als die Gesamtmethanbildungsrate. Aufgrund der niedrigeren RI-Werte (0,2 bis 0,25) kann jedoch ein Einfluss einer syntrophen Acetatoxidation weitgehend ausgeschlossen werden. Die sehr hohen acetoklastischen CH₄-Bildungsraten (P_{ac}) bei Station S können wahrscheinlich durch die Nähe zum Ufer und einen dadurch höheren Eintrag von organischer Biomasse in das Sediment erklärt werden. Sedimentationsraten über diesen Bereich liegen leider nicht vor. Dieser Eintrag resultierte dann höchstwahrscheinlich aus einer stärkeren Fermentation bzw. Acetatproduktion. Der

durch die Fermentation produzierte Wasserstoff wurde zu Methan umgesetzt, was sich in einem relativ hohen f-Faktor bei Station S (Tabelle 11) zeigte. Das Sediment der Station F war im Vergleich zu den anderen Sedimenten stärker substratlimitiert.

Der Vergleich zwischen den Sedimenten der Stationen A, F und S hat gezeigt, dass es innerhalb des Lake Kinneret deutliche Unterschiede bei der Methanproduktion in Bezug auf die Substratwahl und auch die Umsatzzeit der Substrate gab. Diese Unterschiede resultierten wahrscheinlich aus dem unterschiedlichen Nährstoffeintrag, der unterschiedlichen *in situ* Sedimenttemperatur und auch der jahreszeitlich und lokalen unterschiedlichen Anwesenheit von Sauerstoff im Wasser direkt über den Sedimenten.

4.2.4 Bestimmung der Isotopensignatur von CH₄ und CO₂

Die Bestimmung der Isotopensignatur von CH₄ und CO₂ ermöglichte es, weitere Hinweise auf die Substratabhängigkeit der Methanogenese im Profundalsediment des Lake Kinneret zu bekommen. Die wichtigste Beobachtung war hierbei, dass die $\delta^{13}\text{CH}_4$ - und $\delta^{13}\text{CO}_2$ -Werte eine Temperaturabhängigkeit aufwiesen (Abbildung 18 A und B). Dadurch waren auch die Fraktionierungsfaktoren (α_C) von der Temperatur abhängig (Abbildung 19). Diese Temperaturabhängigkeit kann durch mehrere Faktoren hervorgerufen werden. So wurde festgestellt, dass mit einer Temperaturerhöhung oder -erniedrigung gleichzeitig eine Veränderung der $\delta^{13}\text{CH}_4$ bzw. $\delta^{13}\text{CO}_2$ -Werte und der α_C -Werte verbunden ist. Nahm die Temperatur zu, wurden die $\delta^{13}\text{CH}_4$ bzw. $\delta^{13}\text{CO}_2$ -Werte positiver. Nahm die Temperatur jedoch ab, wurden die $\delta^{13}\text{CH}_4$ bzw. $\delta^{13}\text{CO}_2$ -Werte negativer. Dies wurde sowohl bei Versuchen mit Reinkulturen (Botz et al. 1996) als auch in Freilandexperimenten und Experimenten mit Umweltproben (Whiticar et al. 1986, Blair et al. 1993, Jedrysek 1999) gezeigt. Durch das Erstellen eines Modells konnte hierbei die Abhängigkeit von $\delta^{13}\text{CH}_4$, $\delta^{13}\text{CO}_2$ von der Umgebungstemperatur bewiesen werden (Blair et al. 1993). Die andere Möglichkeit ist, dass sich mit einer Veränderung der Inkubationstemperatur auch die Substratspezifität der Methanogenen ändern kann. So lässt sich beim Lake Kinneret zeigen, dass bei 30°C der Anteil der H₂/CO₂-abhängigen Methanogenese größer war als bei 15°C, da erstens der Fraktionierungsfaktor α_C mit 1,058 größer war als bei 15°C und weiter auch das $\delta^{13}\text{CH}_4$ negativer war als bei 15°C. Es wird angenommen, dass der Fraktionierungsfaktor α_C für die acetoklastische Methanogenese im Bereich von 1,040 bis 1,055 liegt (Whiticar et al. 1986). Die im Vergleich zu anderen Ökosystemen (Whiticar et al. 1986) gemessenen sehr

positiven $\delta^{13}\text{CO}_2$ -Werte lassen sich durch das hohe $\delta^{13}\text{C}$ (-11,63 ‰) des organischen Kohlenstoffes im Profundalsediment erklären. Durch die Equilibrierung von CO_2 zwischen der Gasphase und der Flüssigphase kommt es so zu einer Erhöhung von $\delta^{13}\text{CO}_2$. Der $\delta^{13}\text{C}_{\text{org}}$ -Wert von -11,63 ‰ ist im Vergleich zu früheren Messungen, die mit dem Sediment des Lake Kinneret durchgeführt worden sind, negativer (-26,2 ‰, Stiller und Magaritz 1974), was auf eine Veränderung innerhalb des Ökosystems des Lake Kinneret hindeutet. Eine Veränderung der $\delta^{13}\text{C}$ -Werte des organischen Kohlenstoffes kann dadurch entstehen, dass bei der Bindung von CO_2 während der Photosynthese eine unterschiedlich starke Diskriminierung zwischen $^{12}\text{CO}_2$ und $^{13}\text{CO}_2$ durch die CO_2 -fixierenden Organismen im See vorgenommen wird (Takahashi et al. 1990). So war die Diskriminierung durch photosynthetische Bakterien stärker als durch Phytoplankton. Wenn nun ein unterschiedlich starkes Wachstum der zwei Organismengruppen erfolgt, kommt es nach dem Absterben der Organismen und deren Sedimentation zu einer unterschiedlichen Anreicherung von $\delta^{13}\text{C}$ im Sediment. Im Lake Kinneret wurde nun beobachtet, dass der Kohlenstofffluss in das Sediment durch meteorologische Gegebenheiten besonders beeinflusst wurde, da hierdurch die Algenblüte betroffen war, welche einen direkten Einfluss auf die Sedimentation hatte (Serruya et al. 1980). Ein zusätzlicher Eintrag von Kohlenstoff erfolgt durch den Fluss Jordan im Norden des Sees. Messungen zur Isotopensignatur des Kohlenstoffes im Fluss wurden jedoch nicht durchgeführt.

Die Annahme, dass bei 30°C der Anteil der H_2/CO_2 -abhängigen Methanogenese stärker dominiert, ließ sich aber nur in Kombination mit den [^{14}C]Bikarbonatexperimenten bestätigen. Die Unterschiede bei den Werten des Fraktionierungsfaktors α waren zwischen 30°C und 15°C zu gering. Der Einfluss der Tiefe im Sediment auf die Substratwahl und so die Veränderung von $\delta^{13}\text{CH}_4$ und α_{C} ließ sich somit bei 15°C als auch bei 30°C nachweisen. Das $\delta^{13}\text{CH}_4$ wurde mit zunehmender Tiefe negativer. Während in der obersten Schicht α_{C} bei 30°C 1,049 und bei 15°C 1,046 betrug, wurde, je tiefer man in das Sediment ging, α_{C} größer, was einen stärkeren Einfluss von H_2/CO_2 auf die Gesamtmethanogenese bedeutete. Dieser zunehmende Einfluss kann durch das unterschiedliche Alter des Sediments im Profundalbereich erklärt werden (Schoell 1988). Mit zunehmendem Alter des Sediments geht eine Verarmung an "neuen" Kohlenstoffquellen, wie Acetat, einher. Da diese durch die Methanogenen fermentiert werden, ist das gebildete $\delta^{13}\text{CH}_4$ schwerer als bei der H_2/CO_2 -Reduktion. Da das Alter des Sedimentes mit der Tiefe zunimmt, nimmt folglich auch der Anteil der H_2/CO_2 -Reduktion zu. In Batch-Versuchen, wie sie bei den Ansätzen mit

Sedimentaufschlammungen durchgeführt werden, kann es nun ebenso zu einer Verarmung an "neuen" Kohlenstoffquellen nach einer gewissen Zeit kommen, so dass es auch hier zu einer Zunahme der H_2/CO_2 -Reduktion kommen konnte. Dass bei dem Versuch mit der Zugabe von $[2-^{14}C]$ Acetat nach unterschiedlich langer Vorinkubationszeit auch noch nach 336 h der Acetatumsatz genauso schnell erfolgte wie zu Beginn des Versuches, kann entweder daher kommen, dass Acetat in ausreichendem Maße nachgebildet worden war oder dass die Population der acetoklastischen Methanogenen auch nach einem vollständigem Verbrauch des Substrates noch aktiv war.

$\delta^{13}CO_2$ wurde sowohl bei 15°C als auch bei 30°C mit zunehmender Tiefe positiver, was wahrscheinlich durch die stärkere Diskriminierung zwischen ^{12}C und ^{13}C bei der H_2/CO_2 -abhängigen Methanogenese verursacht wurde und so in einer Anreicherung von ^{13}C resultierte.

Eine ähnliche Beobachtung wurde in Feuchtgebieten (Moor und Marschland) gemacht (Hornibrook et al. 2000). Hierbei wurde jedoch ein Tiefenprofil von 0 bis 180 cm untersucht, während im Lake Kinneret nur die obersten 20 cm analysiert wurden. Die Tendenz, dass mit zunehmender Tiefe auch die α_C -Werte zunehmen, war jedoch identisch. Die Zunahme von α_C kam durch abnehmende $\delta^{13}CH_4$ -Werte und zunehmende $\delta^{13}CO_2$ -Werte zustande und bedeutet eine mit der Tiefe abnehmende acetoklastische Methanogenese und eine zunehmende CO_2 -Reduktion. Eine weitere Möglichkeit ist, dass die Homoacetogenese mit der Tiefe zunimmt. Dies wurde jedoch noch nicht überprüft. Da eine Analyse der einzelnen Sedimentschichten auf ihren Carbonatgehalt und den entsprechenden $\delta^{13}C_{org}$ -Wert nicht durchgeführt worden war, kann keine Beziehung zwischen den $\delta^{13}C_{org}$ -Werten und den $\delta^{13}CO_2$ -Werten hergestellt werden. Die Schlussfolgerung, dass die $\delta^{13}CH_4$ -Werte durch die Zusammensetzung des Sedimentes beeinflusst worden sein könnten, kann somit nicht geliefert werden, wie es für einen anderen See versucht worden war (Woltemate et al. 1984). Im Vergleich zum Profundalsediment von Station A waren α_C und $\delta^{13}CH_4$ der Stationen F und S deutlich größer bzw. negativer (Tabelle 12), was hier in den Sedimenten auf einen noch stärkeren Einfluss der H_2/CO_2 -abhängigen Methanogenese schließen lässt.

Zusammenfassend kann man sagen, dass durch die Bestimmung der Isotopensignatur der im Sediment gebildeten Gase CH_4 und CO_2 die Einordnung der methanogenen Prozesse in die mikrobielle Fermentation bzw. Reduktion zusätzlich erleichtert wurde. Hierbei ist der Übergang von überwiegend acetoklastischer Methanogenese hin zu hydrogenotropher

Methanogenese in Abhängigkeit von der Inkubationszeit und auch der Tiefe im Sediment deutlich gezeigt worden.

4.3 Einfluss von verschiedenen Substraten auf die Isotopensignatur des gebildeten Methans im Plußsee und Lake Kinneret

Durch die Zugabe von Substraten zu vorbereiteten Sedimentaufschlämmungen des Plußsees und des Lake Kinneret sollten einerseits die Effekte einer Stimulation auf die Methanbildung untersucht, aber andererseits auch die Beeinflussung verschiedener Substrate auf die Isotopensignatur von CH₄ und CO₂ demonstriert werden.

4.3.1 Plußsee

Die Beeinflussung von zugegebenen Substraten auf die Isotopensignatur von CH₄ trat direkt nach der Zugabe auf (Abbildungen 20 A und B). Da von vornherein ein Unterschied zwischen den $\delta^{13}\text{CH}_4$ -Werten der Kontrollen und der Ansätze mit H₂-Zugabe oder Acetatzugabe bestand, kann davon ausgegangen werden, dass das Methan in diesen Ansätzen ausschließlich aus den zugegebenen Substraten gebildet wurde. Diese Aussage konnte sowohl für die Experimente mit Plußseesediment als auch für die Experimente mit Profundalsediment aus Lake Kinneret gemacht werden. Betrachtet man nun näher den Plußsee, so sieht man, dass die $\delta^{13}\text{CH}_4$ -Werte der Ansätze mit zugegebenem Wasserstoff nicht, wie erwartet, negativer als die Ansätze mit Acetat als Substrat waren, sondern sogar positiver. Das kann bedeuten, dass der Wasserstoff zuerst von Homoacetogenen zu Acetat umgesetzt wurde und erst dann das gebildete Acetat zu Methan reduziert wurde. Stichpunktartige pH-Messungen des Porenwassers, verteilt über den ganzen Versuchszeitraum, ergaben eine Abnahme des pH-Wertes von 7,0 auf 4,5, was auf eine Produktion von organischen Säuren hindeutete. Ein pH-Wert von 4,5 ist für Methanogene zu niedrig. Diese Annahme traf sowohl auf die Versuche zu, die bei 25°C durchgeführt wurden, als auch auf die Versuche bei 4°C. Für die Homoacetogenese spricht außerdem noch, dass die $\delta^{13}\text{CO}_2$ -Werte in den Ansätzen mit H₂ als Substrat im Verlauf der gesamten Inkubation sehr stark positiv wurden (bei 25°C bis zu + 50 ‰). Das ergibt sich durch die bei der Homoacetogenese stattfindende Diskriminierung zwischen ¹³CO₂ und ¹²CO₂ und die dabei entstehende Anreicherung von ¹³CO₂. Diese Ergebnisse und auch diese Schlussfolgerungen

stehen im Gegensatz zu Beobachtungen, die in anderen Habitaten durchgeführt wurden (Hornibrook et al. 2000). Hierbei wurde postuliert, dass im Falle einer Homoacetogenese die $\delta^{13}\text{CH}_4$ -Werte und $\delta^{13}\text{CO}_2$ -Werte nahe an den Werten liegen, die bei einer hydrogenotrophen Methanogenese gemessen wurden. Diese Beobachtungen wurden bei Versuchen gemacht, bei denen die Wasserstoffkonzentration in den Reaktionsgefäßen nicht verändert wurde.

Wurde Acetat dazugegeben, lagen die $\delta^{13}\text{CH}_4$ -Werte im Bereich von -40‰ , ein Wert, der auch bei Untersuchungen mit Reinkulturen gefunden worden war (Krzycki et al. 1987, Gelwicks et al. 1994). Dieser Wert blieb sowohl bei den 25°C -Inkubationen als auch bei den 4°C -Inkubationen über den gesamten Zeitraum konstant. Die $\delta^{13}\text{CO}_2$ -Werte nahmen nach der Acetat-Zugabe sowohl bei 25°C als auch bei 4°C ab. Dies kam daher, dass das bei der Acetatspaltung durch die Oxidation der Carboxylgruppe frei werdende $\delta^{13}\text{CO}_2$ einen Wert von $-31,6\text{‰}$ hatte und so das gesamte $\delta^{13}\text{CO}_2$ in den Sedimentaufschlämmungen erniedrigte. Die Beobachtung, dass nach der Methanol-Zugabe bei 25°C die $\delta^{13}\text{CH}_4$ -Werte stark negativ wurden und dann plötzlich wieder auf den Ursprungswert zurückgingen, kann dadurch erklärt werden, dass in der Phase der Abnahme von $\delta^{13}\text{CH}_4$ das Methanol auf einmal verbraucht wurde, dadurch die $\delta^{13}\text{CH}_4$ -Werte negativer wurden und nach dem Verbrauch des Methanols wieder das Methan aus den ursprünglichen Substraten produziert wurde. Methanol stimulierte nicht bei 4°C die Methanproduktion (Anhang Tabelle 6), so dass keine Veränderungen von $\delta^{13}\text{CH}_4$ und $\delta^{13}\text{CO}_2$ festzustellen waren.

Die Bestimmung der Isotopensignatur des gebildeten CH_4 und CO_2 in den Ansätzen mit zugegebenem Substrat hat gezeigt, dass diese Methode zusätzliche Hinweise auf die im Sediment ablaufenden Stoffwechselwege geben kann. So war der Umsatz von Wasserstoff zu Acetat durch Homoacetogene anhand der Änderungen der $\delta^{13}\text{CH}_4$ - und $\delta^{13}\text{CO}_2$ -Werte sehr deutlich zu erkennen. Auch konnte so gezeigt werden, dass sich die Isotopensignatur in Abhängigkeit der vorhandenen Substrate änderte.

4.3.2 Lake Kinneret

Mit dem Profundalsediment des Lake Kinneret wurden zusätzlich zu den Stimulationsexperimenten mit Wasserstoff, Acetat und Methanol noch Untersuchungen über den Einfluss von Butyrat, Formiat und Propionat auf die Methanproduktion durchgeführt. Da Formiat bei 30°C keine Stimulation und bei 15°C nur eine sehr geringe Stimulation der Methanogenese bewirkte, kann man Formiat als ein direktes Substrat der Methanogenese ausschließen (Abbildungen 22 A und B). Es wurde zwar sofort nach der Zugabe zu H_2 und

CO₂ umgesetzt, wie man an den stark ansteigenden H₂-Konzentrationen sehen kann (Abbildung 23 A und B), bewirkte aber dennoch keine höhere Methanbildung. Bei 15°C stimulierte das für die Methanogenen am einfachsten verwertbare Acetat die Methanproduktion sofort. Butyrat und Propionat zeigten erst nach einer lag-Phase einen stimulativen Effekt auf die Methanogenese. Bei 30°C hingegen wurde in den Ansätzen mit Butyrat die Methanproduktion am schnellsten stimuliert. Dies lässt sich dadurch erklären, dass bei einer höheren Temperatur die Fermentation von Butyrat zu Acetat schneller ablaufen kann, so dass das für die acetoklastische Methanogenese notwendige Acetat schnell verfügbar war. Diese schnelle Umsetzung von Butyrat zu Methan deutet darauf hin, dass die einzelnen Reaktionen in denselben Aggregaten stattfanden, da sonst die Wasserstoffkonzentrationen in den Sedimentaufschlämmungen deutlich ansteigen müssten, was hier nicht der Fall war. Man kann somit annehmen, dass auch hier diese Aggregate aus fermentierenden Bakterien, syntrophen Acetatoxidierern und Methanogenen bestanden. Die Beobachtung, dass bei 15°C der bei der Formiatspaltung freiwerdende Wasserstoff nur sehr langsam verbraucht wurde, bestärkt die Annahme, dass bei niedrigeren Temperaturen die hydrogenotrophe Methanogenese nur in vermindertem Maße stattfindet.

Diese Ergebnisse zeigen deutlich, dass es in Bezug auf die Verwertbarkeit der Substrate durch die Methanogenen Unterschiede gab, die durch die unterschiedliche Inkubationstemperatur verursacht wurden. Bei der *in situ* Temperatur von 15°C und bei 30°C wurden nur Acetat und Butyrat sofort verwertet. Propionat konnte erst nach einer lag-Phase umgesetzt werden, was darauf hindeutet, dass erst die Population der syntrophen Propionatverwerter soweit anwachsen musste, bis das zugegebene Propionat in Acetat gespalten werden konnte. Dies ging bei 30°C schneller als bei 15°C. Formiat konnte hingegen sowohl bei 15°C als auch bei 30°C nicht als ein direktes Substrat der Methanogenen bestimmt werden.

Im Gegensatz zum Plußsee, wo zugegebenes Acetat bei der *in situ* Temperatur von 4°C die Methanogenese nicht stimulierte, stimulierte im Lake Kinneret das zugegebene Acetat die Methanogenese bei der *in situ* Temperatur von 15°C (Abbildung 24 B). Im Vergleich zu dem zugegebenen Methanol und Wasserstoff stimulierte Acetat auch am schnellsten die Methanogenese. Setzt man nun die gemessenen CH₄-Konzentrationen in Beziehung zu den δ¹³CH₄-Werten, so erkennt man einen direkten Bezug zwischen der Umsetzung der Substrate und der Isotopensignatur des gebildeten Methans. Am deutlichsten sieht man dies bei den Ansätzen mit zugegebenem Methanol. Wie auch schon im Plußsee, kommt es nach

der Zugabe zu einer starken Abnahme der $\delta^{13}\text{CH}_4$ -Werte. Wenn man nun diese Abnahme mit den gemessenen CH_4 -Konzentrationen vergleicht, ist auffallend, dass in diesem Zeitraum keine stärkere Stimulierung der Methanogenese im Vergleich zu der Kontrolle stattfand. Erst nachdem die $\delta^{13}\text{CH}_4$ -Werte wieder positiver wurden, fand eine deutliche Stimulation statt, die jedoch nur in einem Zeitraum von 75 h sichtbar war. Danach war in der CH_4 -Produktionsrate kein Unterschied zu der Kontrolle erkennbar. Diese zeitlich versetzte Stimulation und auch Veränderung der Isotopensignatur könnte dadurch zustande kommen, dass das zugegebene Methanol die acetoklastische und auch hydrogenotrophe Methanogenese am Anfang so lange hemmte, bis es von den Methanol verwertenden Methanogenen verbraucht worden war. Dass die $\delta^{13}\text{CH}_4$ -Werte dabei negativer wurden, wurde schon bei Reinkulturen, die Methanol als Substrat verwerten können, beobachtet (Krzycki et al. 1987). Nachdem nun das Methanol verbraucht worden war, wurde Methan wieder aus Acetat und Wasserstoff produziert, was zu einem Anstieg der $\delta^{13}\text{CH}_4$ -Werte führte. Wurde nun dieses Experiment bei 15°C durchgeführt, konnte dieselbe Beobachtung, nur über einen längeren Zeitabschnitt, gemacht werden. Dies deutet darauf hin, dass es bei der Methanolverwertung im Profundalsediment des Lake Kinneret keine Abhängigkeit von der Inkubationstemperatur gab.

Zugegebener Wasserstoff in einer Konzentration größer als 4000 Pa wurde im Profundalsediment des Lake Kinneret ebenso wie im Plußsee durch Homoacetogenese zu Acetat umgesetzt. Analysen des Porenwassers ergaben eine Akkumulation von Acetat im Plußsee bis zu 15 mM und im Lake Kinneret bis zu 20 mM. Diese Umsetzung begann auch direkt nach der Zugabe, da die $\delta^{13}\text{CH}_4$ -Werte von vornherein positiver als in den Kontrollen waren. Während der ganzen Inkubationszeit blieben dann die $\delta^{13}\text{CH}_4$ -Werte nahezu konstant. Da die $\delta^{13}\text{CO}_2$ -Werte zunahm, deutet dies auch hier auf eine starke Diskriminierung von $^{13}\text{CO}_2$ bei der Homoacetogenese hin. Thermodynamisch war die Homoacetogenese sowohl im Plußsee als auch im Lake Kinneret nur bei höheren H_2 -Partialdrücken möglich, da bei den *in situ* Konzentrationen die Homoacetogenese strikt endergon war (siehe Anhang: Tabelle 2; Tabelle 6).

Im Gegensatz zum Plußsee, bei dem die $\delta^{13}\text{CH}_4$ -Werte nach der Zugabe von Acetat konstant blieben (Abbildung 20 A und B), kam es beim Profundalsediment von Lake Kinneret zu einer leichten, aber konstanten Abnahme der $\delta^{13}\text{CH}_4$ -Werte (Abbildung 25 A und B). Diese Abnahme begann, nachdem das zugegebene Acetat sowohl bei 15°C als auch bei 30°C umgesetzt war. Dies erkennt man daran, dass sich die Steigung der Methankonzentrationsgeraden in den Sedimentaufschlammungen mit Acetat nicht von der

Steigung in den Kontrollansätzen unterschied. Wenn nun die $\delta^{13}\text{CH}_4$ -Werte negativer wurden, kann dies durch einen zunehmenden Einfluss der hydrogenotrophen Methanogenese auf die Gesamtmethanogenese erklärt werden. Hierbei werden, wie oben angesprochen, die $\delta^{13}\text{CH}_4$ -Werte negativer. Das kann in diesem Fall entweder dadurch kommen, dass nicht mehr genügend Acetat, verglichen zu dem anderen Substrat H_2/CO_2 , für die Methanogenese vorhanden war, oder dass das Acetat oxidativ von syntrophen Bakterien gespalten wurde, was zu einem nachfolgenden Anstieg der hydrogenotrophen Methanogenese führte. Eine Kombination von beiden Annahmen erscheint hier am wahrscheinlichsten. Diese Abnahme der $\delta^{13}\text{CH}_4$ -Werte war bei 30°C stärker als bei 15°C , womit auch eine Parallele zu den höheren Fraktionierungsfaktoren bei der Bestimmung des Anteils der H_2/CO_2 -abhängigen Methanogenese gezeigt worden war. Hiermit ist gezeigt worden, dass die Ergebnisse aus den Experimenten mit zugegebenem ^{14}C -Bikarbonat und die Ergebnisse der Isotopieuntersuchungen darin übereinstimmen, dass nach einem Zeitraum von 200 - 250 h bei 30°C und 15°C der Anteil der H_2/CO_2 -abhängigen Methanogenese zunahm. Dies kann nun zum einen aus einer Verarmung an Acetat herrühren, zum anderen aber kann aber der Anteil der syntrophen Acetatoxidation zugenommen haben.

Wie auch schon beim Plußsee konnten auch im Lake Kinneret die Stoffwechselwege durch die Bestimmung der Isotopensignaturen von dem gebildeten CH_4 und CO_2 eingeordnet werden. Bei den Ansätzen mit Acetat und Methanol waren die $\delta^{13}\text{CH}_4$ -Werte mit denen der 25°C -Ansätze des Plußsees vergleichbar. Wurde Wasserstoff dazugegeben, waren sie aber negativer als bei den Ansätzen mit Sediment aus dem Plußsee.

Anzumerken aber ist, dass nur in der Kombination der Analytik, bestehend aus der Bestimmung der Isotopensignatur und der Bestimmung des Umsatzes von ^{14}C -markierten Substraten eine sichere Aussage über die Stoffwechselwege, die im Sediment bei der Bildung von Methan vorherrschend sind, getroffen werden kann.

Ausblick:

Die bei den aufgeführten Experimenten erhaltenen Ergebnisse haben gezeigt, dass bei beiden Seen die Stoffwechselwege, die zur Methanbildung führen, in ihren Grundzügen aufgeklärt worden sind. Es sind hierbei aber noch weitere Fragen aufgetreten, die das Verständnis über die Methanbildung im Seesediment noch erweitern können:

- Welche Organismen sind in der syntrophen Acetatoxidation involviert? Hierbei wäre es interessant, durch Isolierung dieser Organismen einen genaueren Einblick zu bekommen.
- Wie sieht die Populationsgemeinschaft der *Archaea*, im speziellen der Methanogenen aus? Ein Ansatzpunkt wäre hierbei die Anwendung molekularbiologischer Methoden wie T-RFLP und Sequencing.
- Die Daten, die bei der Bestimmung der Isotopensignatur von CH₄ und CO₂ erhoben wurden, haben gezeigt, dass durch die Zugabe von Substraten die Isotopensignatur deutlich verändert wurde. Ein Ansatzpunkt, um genauer auf diese Frage einzugehen, wäre der Versuch, ein mathematisches Modell über diese Vorgänge zu erstellen.

5. Literaturverzeichnis

Achtnich, C., Schuhmann, A., Wind, T. und Conrad, R. 1995. Role of interspecies H₂ transfer to sulfate and ferric iron-reducing bacteria in acetate consumption in anoxic paddy soil. *FEMS Microbiol. Ecol.* **16**: 61-70.

Adams, D.D. und Naguib, M. 1999. Carbon gas cycling in the sediments of Plußsee, a northern German eutrophic lake, and 16 nearby water bodies of Schleswig-Holstein. *Arch. Hydrobiol. Spec. Issues Advanc. Limnol.* **54**: 91-104.

Atkins, P.W. 1996. The elements of physical chemistry. 2nd edition. Oxford University Press, Oxford.

Avery, JR., G.B., Shannon, R.D., White, J.R., Martens, C.S. und Alperin, M.J. 1999. Effect of seasonal changes in the pathways of methanogenic on the $\delta^{13}\text{C}$ values of pore water methane in a Michigan peatland. *Global Biogeochem. Cycles* **13**: 475-484.

Barker, H.A. 1936. On the biochemistry of the methane fermentation. *Arch. Microbiol.* **7**:404-419.

Blair, N.E., Boehme, S.E. und Carter JR., W.D. 1993. The carbon isotope biogeochemistry of methane production in anoxic sediments: 1. Field observations - In: Oremland, R., S. (Hrsg.): *Biogeochemistry of Global Change*. Seite 574-593, Chapman & Hall, New York

Boschker, H.T.S., Dekkers, E.M.J., Pel, R. und Cappenberg, T.E. 1995. Sources of organic carbon in the littoral of Lake Gooimeer as indicated by stable carbon isotope and carbohydrate compositions. *Biogeochem.* **29**: 89-105.

Botz, R., Pokojski, H.D., Schmitt, M. und Thomm, M. 1996. Carbon isotope fractionation during bacterial methanogenesis by CO₂ reduction. *Org. Geochem.* **25**: 255-262.

Brand, W.A. 1996. High precision isotope ratio monitoring techniques in mass spectrometry. *J. Mass Spectrometry* **31**:225-235.

Brock, T.D., Madigan, M.T., Martinko, J.M. und Parker, J. 1994. Biology of microorganisms. 7nd Edition, Prentice Hall, New Jersey.

Burke, R.A., Martens, C.S. und Sackett, W.M. 1988. Seasonal variations of D/H and $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ratios of microbial methane in surface sediments. *Nature* **332**: 829-831.

Burke, R.A. Barber, T.R. und Sackett, W.M. 1992. Seasonal variations of stable hydrogen and carbon isotope ratios of methane in subtropical freshwater sediments. *Global Biochemical Cycles* **6**: 125-138.

Capone, D.G. und Keine, R.P. 1988: Comparison of microbial dynamics in marine and freshwater sediments: contrasts in anaerobic carbon catabolism. *Limnol. Oceanogr.* **33**: 7258-749.

Cappenberg, T.E. 1974. Interrelations between sulfate-reducing and methane-producing bacteria in bottom deposits of a fresh-water lake. I. Field observations. *Ant. Leeuwenhoek* **40**: 285-295.

Cappenberg, T.E. und Prins, R.A. 1974. Interrelations between sulfate-reducing and methane-producing bacteria in bottom deposits of a fresh-water lake. III. Experiments with ^{14}C -labeled substrates. *Ant. Leeuwenhook* **40**: 297-306.

Casper, P. 1992. Methanhaushalt in baltischen Seen unterschiedlicher Trophiestufe. *Limnologica* **22**: 121-128.

Casper, P. 1996. Methane production in littoral and profundal sediments of an oligotrophic and a eutrophic lake. *Arch. Hydrobiol. Issues Advanc. Limnol.* **48**: 253-259.

Chidthaisong, A. und Conrad, R. 2000. Turnover of glucose and acetate coupled to reduction of nitrate, ferric iron and sulfate and to methanogenesis in anoxic rice field soil. *FEMS Microbiol. Ecol.* **31**: 73-86.

Chin, K.-J. 1996. Methanogenic degradation of polysaccharides in rice field soil. Dissertation, Hartung-Gorre Verlag, Konstanz.

Conrad, R., Aragno, M. und Seiler, W. 1983. Production and consumption of hydrogen in a eutrophic lake. *Appl. Environ. Microbiol.* **45**: 502-510.

Conrad, R., Schink, B. und Phelps, T.J. 1986. Thermodynamics of H₂-consuming and H₂-producing metabolic reactions in diverse methanogenic environments under in situ conditions. *FEMS Microbiol. Ecol.* **38**: 353-360.

Conrad, R., Goodwin, S. und Zeikus, J.G. 1987. Hydrogen metabolism in a mildly acidic lake sediment (Knaack Lake). *FEMS Microbiol. Ecol.* **45**: 243-249.

Conrad, R. und Schütz, H. 1988. Methods of studying methanogenic bacteria and methanogenic activities in aquatic environments - In: Austin, B. (Hrsg.): *Methods in Aquatic Bacteriology*. John Wiley & Sons, New York.

Conrad, R., Bak, F., Seitz, H.J., Thebrath, B., Mayer, H.P. und Schütz, H. 1989. Hydrogen turnover by psychrotrophic homoacetogenic and mesophilic methanogenic bacteria in anoxic paddy soil and lake sediment. *FEMS Microbiol. Ecol.* **62**: 286-294.

Conrad, R. und Wetter, B. 1990. Influence of temperature on energetics of hydrogen metabolism in homoacetogenic, methanogenic, and other anaerobic bacteria. *Arch. Microbiol.* **155**: 94-98.

Conrad, R. 1999. Contribution of hydrogen to methane production and control of hydrogen. *FEMS Microbiol. Ecol.* **28**: 193-202.

Conrad, R. und Klose, M. 1999. Anaerobic conversion of carbon dioxide to methane, acetate and propionate on washed rice roots. *FEMS Microbiol. Ecol.* **30**: 147-155.

Cord-Ruwisch, R., Seitz, H.J. und Conrad, R. 1988. The capacity of hydrogenotrophic anaerobic bacteria to compete for traces of hydrogen depends on the redox potential of the terminal electron acceptor. *Arch. Microbiol.* **149**: 350-357.

De Graaf, W., Wellsbury, P., Parkes, R.J. und Cappenberg, T.E. 1996. Comparison of acetate turnover in methanogenic and sulfate-reducing sediments by radiolabeling and stable isotope labeling and by use of specific inhibitors: Evidence for isotopic exchange. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 772-777.

De Graaf, W. und Cappenberg, T.E. 1996. Evidence for isotopic exchange during metabolism of stable- isotope-labeled formate in methanogenic sediment. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 3535-3537.

Drake, H.L., Aumen, N.G., Kuhner C., Wagner Ch., Grieshammer A. und Schmittroth, M. 1996. Anaerobic microflora of everglades sediments: effects of nutrients on population profiles and activities. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 486-493.

Eckert, W., Conrad, R., Nüßlein, B., Uri, E., Didenko, J., Hadas, O. und Walline, P. 2000. Methane evolution in warm-monomictic lake: sources, sinks and its role in carbon cycling. Annual Report 1.1.99 to 31.12.99, BMBF.

Frenzel, P. und Bosse, U. 1996. Methyl fluoride, an inhibitor of methane oxidation and methane production. *FEMS Microbiol. Ecol.* **21**: 25-36.

Gal'chenko, V.F. 1994. Sulfate reduction, methane production, and methane oxidation in various water bodies of bunger hills oasis of Antarctica. *Microbiologiya* **63**: 683-698.

Games, L.M. und Hayes, J.M. 1978. Methane-producing bacteria: natural fractionations of the stable carbon isotopes. *Geochim. et Cosmochim. Acta* **42**: 1295-1297.

Garcia, J.L. 1990. Taxonomy and ecology of methanogens. *FEMS Microbiol. Reviews* **87**: 297-308.

Gelwicks, J.T., Risatti, J.B. und Hayes, J.M. 1994. Carbon isotope effects associated with acetoclastic methanogenesis. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 467-472.

Gophen, M. und Nishri, A. 1994. Lake Kinneret. *Arch. Hydrobiol.* **44**: 65-71.

Hadas, O. und Pinkas, R. 1992. Sulfate-reduction process in sediments of Lake Kinneret, Israel. *Hydrobiologie* **235/236**: 295-301.

Hadas, O. und Pinkas, R. 1995 a. Sulfate reduction in the hypolimnion and sediments of Lake Kinneret, Israel. *Freshwater Biology* **33**: 63-72.

Hadas, O. und Pinkas, R. 1995 b. Sulfate reduction processes in sediments at different sites in Lake Kinneret, Israel. *Microbiol. Ecol.* **30**: 55-66.

Heyer, J. und Babenzien, H.-D. 1985. Untersuchungen des Methankreislaufes in einem oligotrophen See (Stechlinsee). *Limnologica* **16**: 267-276.

Hornibrook, E.R.C., Longstaffe, F.J. und Fyfe, W.S. 1997. Spatial distribution of microbial methane production pathways in temperate zone wetland soils: Stable carbon and hydrogen isotope evidence. *Geochim. et Cosmochim. Acta* **61**: 745-753.

Hornibrook, E.S.C., Longstaffe, F.J. und Fyfe, W.S. 2000. Evolution of stable carbon isotope compositions for methane and carbon dioxide in freshwater wetlands and other anaerobic environments. *Geochim. et Cosmochim. Acta* **64**: 1013-1027.

Imboden, D.M. 1990. Mixing and transport in lakes: mechanisms and ecological relevance - In: Tilzer, M.M. und Serruya, C. (Ed): *Large lakes. Ecological structure and function*, Seite 47-80, Springer, Berlin.

Ingvorsen, K., Zeikus, J.G. und Brock, T.D. 1981. Dynamics of bacterial sulfate reduction in a eutrophic lake. *Appl. Environ. Microbiol.* **42**: 1029-1036.

Janssen, P.H. und Frenzel, P. 1997. Inhibition of methanogenesis by methyl fluoride: Studies of pure and defined mixed cultures of anaerobic bacteria and archaea. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 4552-4557.

Jedrysek, M.O. 1995. Carbon isotopic evidence for diurnal variations in methanogenesis in freshwater lake sediments. *Geochim. et Cosmochim. Acta* **59**: 557-561.

Jedrysek, M.O. 1999. Spatial and temporal patterns in diurnal variations of carbon isotope ratios of early-diagenetic methane from freshwater sediments. *Chem. Geol.* **159**: 241-262.

Jones, J.G., Simon, B.M. und Gardener, S. 1982. Factors affecting methanogenesis and associated anaerobic processes in the sediments of a stratified eutrophic lake. *J. Gen. Microbiol.* **128**: 1-11.

Kotsyurbenko, O.R., Nozhevnikova, A.N. und Zavarin, G.A. 1993. Methanogenic degradation of organic matter by anaerobic bacteria at low temperature. *Chemosphere* **27**: 1745-1761.

Koyama, T. 1955. Gaseous metabolism in lake muds and paddy soils. *J. of Earth Science, Nagoya University* **3**: 65-76.

Krzycki, J.A., Kenealy, W.R., DeNiro, M.J. und Zeikus, J.G. 1987. Stable carbon isotope fractionation by *Methanosarcina barkeri* during methanogenesis from acetate, methanol, or carbon dioxide-hydrogen. *Appl. Environ. Microbiol.* **October**: 2597-2599.

Kuivila, K.M., Murray, J.W. und Devol, A.H. 1988. Methane cycling in the sediments of Lake Washington. *Limnol. Oceanogr.* **33**: 571-581.

Kuivila, K.M. und Lovley, D.R. 1996. Dissolved hydrogen concentrations in sulfate-reducing and methanogenic sediments. *Aquatic hydrobiology* **25**: 55-62.

Lee, M.J. und Zinder S.H. 1988. Hydrogen partial pressures in a thermophilic acetate-oxidizing methanogenic coculture. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**: 1457-1461.

Lide, D.R. 1999. *CRC Handbook of chemistry and physics*. CRC Press, London.

Lojen, S., Ogrinc, N. und Dolenc, T. 1999. Decomposition of sedimentary organic matter and methane formation in the recent sediment of Lake Bled (Slovenia). *Chem. Geol.* **159**: 223-240.

Lovley, D.R. und Klug, M.J. 1982. Intermediary metabolism of organic matter in the sediments of a eutrophic lake. *Appl. Environ. Microbiol.* **43**: 552-560.

Naguib, M. 1982. Methanogenese im Sediment der Binnengewässer 1. Methanol als dominanter Methan-"Precursor" im Sediment eines eutrophen Sees. *Arch. Hydrobiol.* **95**: 317-329.

Naguib, M. 1988. Kinetics of acetate and methanol conversion into methane in eutrophic sediments and its application in anaerobic systems. *Wat. Sci. Tech.* **20**: 61-67.

Namsarev, B.B., Dulov, L.E., Sokolova, E.N. und Zemskaya, T.I. 1995. Bacterial methane production in the bottom sediments of Lake Baikal. *Microbiology* **64**: 346-352.

Nozhevnikova, A.N., Kotsyurbenko, O.R. und Simankova, M.V. 1994. Acetogenesis at low temperature - In: Drake, H.L. (Hrsg.): *Acetogenesis*, Seite 416-431, Chapman & Hall., New York.

Nozhevnikova, A.N., Holliger, C., Ammann, A. und Zehnder, A.J.B. 1997. Methanogenesis in sediments from deep lakes at different temperatures (2-70°C). *Wat. Sci. Tech.* **36**: 57-64.

Overbeck, J. und Chróst, R.J. 1994. *Microbial ecology of Lake Plußsee*. Springer, Berlin.

Phelps, T.J. und Zeikus, J.G. 1984. Influence of pH on terminal carbon metabolism in anoxic sediments from a mildly acidic lake. *Appl. Environ. Microbiol.* **48**: 1088-1095.

Phelps, T.J. und Zeikus, J.G. 1985. Effect of fall turnover on terminal carbon metabolism in Lake Mendota sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **50**: 1285-1291.

Ponnamperuma, F.N. 1972. The chemistry of submerged soils. *Adv. Agron.* **24**: 29-96.

Rudd, J.W.M. und Hamilton, R.D. 1978. Methane cycling in a eutrophic shield lake and its effects on whole lake metabolism. *Limnol. Oceanogr.* **23**: 337-348.

Rudd, J.W.M. und Taylor, C.D. 1980. Methane cycling in aquatic environments. *Adv. Aquatic Microbiol.* **2**: 77-150.

Schink, B. und Zeikus, J.G. 1982. Microbial ecology of pectin decomposition in anoxic lake sediments. *J. Gen. Microbiol.* **128**: 393-404.

Schink, B. 1997. Energetics of syntrophic cooperation in methanogenic degradation. *Microbiol. and Molecul. Biol. Reviews* **61**: 262-280.

Schnürer, A., Schink, B. und Svensson B.H. 1996. *Clostridium ultuense* sp. Nov., a mesophilic bacterium oxidizing acetate in syntrophic association with a hydrogenotrophic methanogenic bacterium. *Int. J. of systematic bacteriology* **46**: 1145-1152.

Schnürer, A., Svensson, B.H. and Schink, B. 1997. Enzyme activities in and energetics of acetate metabolism by the mesophilic syntrophically acetate-oxidizing anaerobe *Clostridium ultuense*. *FEMS Microbiol. Letters* **154**: 331-336.

Schnürer, A., Zellner, G. und Svensson B.H. 1999. Mesophilic syntrophic acetate oxidation during methane formation in biogas reactors. *FEMS Microbiol Ecol.* **29**: 249-261.

Schoell, M. 1988. Multiple origins of methane in the earth. *Chem. Geol.* **71**: 1-10.

Schoell, M., Tietze, K. und Schoberth, S.M. 1988. Origin of methane in Lake Kivu (East-Central Africa). *Chem. Geol.* **71**: 257-265.

Scholten, J.C.M., Oude Elferink, S.W.M. und Stams, A.J.M. 1999. Acetate mineralization in freshwater sediments – In: Scholten, J.C.M. (Hrsg.) The influence of sulfate and nitrate on the methane formation by methanogenic archaea in freshwater sediments. Dissertation

Scholten, J.C.M., Conrad, R. und Stams, A.J.M. 2000. Effect of 2-bromo-ethane sulfonate, molybdate and chloroform on acetate consumption by methanogenic and sulfate-reducing populations in freshwater sediment. *FEMS Microbiol. Ecol.* **32**: 35-42.

Schönheit, P. 1993. Bioenergetics and transport in methanogens and related thermophilic archaea - In: Kates, M., Kushner, D.J. und Metheson, A.T. (Hrsg.): The biochemistry of archaea (Archaeobacteria). Seite 113-172. Elsevier, Amsterdam.

Schulz, S. und Conrad, R. 1996. Influence of temperature on pathways to methane production in the permanently cold profundal sediment of Lake Constance. *FEMS Microbiol. Ecol.* **20**: 1-14.

Schulz, S., Matsuyama, H. und Conrad, R. 1997. Temperature dependence of methane production from different precursors in a profundal sediment (Lake Constance). *FEMS Microbiol. Ecol.* **22**: 207-213.

Schütz, H., Seiler, W. und Conrad, R. 1989. Processes involved in formation and emission of methane in rice paddies. *Biogeochem.* **7**: 33-53.

Serruya, C., Gophen, M. und Pollinger, U. 1980. Lake Kinneret: Carbon flow patterns and ecosystem management. *Arch Hydrobiol.* **88**: 265-302.

Shannon, R.D. und White, J.R. 1996. The effects of spatial and temporal variations in acetate and sulfate on methane cycling in two Michigan peatlands. *Limnol. Oceanogr.* **41**: 435-443

Sinke, A.J.C., Cornelese, A.A., Cappenberg, T.E. und Zehnder, A.J.B. 1992. Seasonal variation in sulfate reduction and methanogenesis in peaty sediments of eutrophic Lake Loosdrecht, The Netherlands. *Biogeochem.* **16**: 43-61.

Smith, R.L. und Klug, M.J. 1981. Reduction of sulfur compounds in the sediments of a eutrophic lake basin. *Appl. Environ. Microbiol.* **41**: 1230-1237.

Smith, R.L. und Klug, M.J. 1981. Electron donors utilized by sulfate-reducing bacteria in eutrophic lake sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **42**: 116-121.

Stiller, M. und Magaritz, M. 19 . Carbon-13 enriched carbonate in interstitial waters of Lake Kinneret sediments. *Limnol. Oceanogr.* **19**: 849-853.

Stumm, W. und Morgan, J.J. 1996. *Aquatic chemistry: chemical equilibria and rates in natural waters*. 3rd Edition. John Wiley & Sons, New York.

Sugimoto, A., Hong, X. und Wada, E. 1991. Rapid and simple measurement of carbon isotope ratio of bubble methane using GC/C/IRMS. *Mass Spectros.* **39**: 261-266.

Sugimoto, A. und Wada, E. 1993. Carbon isotopic composition of bacterial methane in a soil incubation experiment: Contributions of acetate and CO₂/H₂. *Geochim. et Cosmochim. Acta* **57**: 4015-4027.

Sweerts, J-P.R.A., Bär-Gilissen, M-J., Cornelese, A.A. und Cappenberg T.E. 1991. Oxygen-consuming processes at the profundal and littoral sediment-water interface of a small meso-eutrophic lake (Lake Vechten, The Netherlands). *Limnol. Oceanogr.* **36**: 1124-1132.

Takahashi, K., Wada, E. und Sakamoto, M. 1990. Carbon isotope discrimination by phytoplankton and photosynthetic bacteria in monomictic Lake Fukami-Ike Japan. *Archiv für Hydrobiologie* **120**: 197-210.

Takii, S., Li, J.H. und Hayashi, H. 1997. Methane Production and sulfate reduction in profundal sediments in Lake Kizaki, Japan. *Jpn. J. Limnol.* **58**: 373-384.

Tessenow, U., Frevert, W., Hofgärtner, W. und Moser, A. 1977. Ein simultan schließender Wasserschöpfer für Sedimentkontaktwasser mit fotoelektrischer Selbstausslösung und fakultativem Sedimentstecher. *Arch. Hydrobiol. Suppl.* **48**:438-452.

Thauer, R.K., Jungermann K. und Decker, K. 1977. Energy conservation in chemotrophic anaerobic bacteria. *Bacteriol. Reviews* **41**: 100-180.

Thebrath, B., Rothfuss, F., Whiticar, M.J. und Conrad, R. 1993. Methane production in littoral sediment of Lake Constance. *FEMS Microbiol. Ecol.* **102**: 279-289.

Thibodeau, P.M. 1996. The origin and distribution of methane in Lake Champlain sediments. *Northeastern Geology and Environ. Sciences* **18**: 130-136.

Toerien, D.F. und Cavari, B. 1982. Effect of temperature on heterotrophic glucose uptake, mineralization, and turnover rates in Lake Kinneret. *Appl. Environ. Microbiol.* **43**: 1-5.

Westermann, P. und Ahring, B.K. 1987. Dynamics of methane production, sulfate reduction, and denitrification in a permanently waterlogged alder swamp. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**:2554-2559.

Westermann, P. 1994. The effect of incubation temperature on steady-state concentrations of hydrogen and volatile fatty acids during anaerobic degradation in slurries from wetland sediments. *FEMS Microbiol. Ecol.* **13**: 295-302.

Whiticar, M.J., Faber, E. und Schoell, M. 1986. Biogenic methaneformation in marine and freshwater environments: CO₂ reduction versus acetate fermentation-Isotope evidence. *Geochim. et Cosmochim. Acta* **50**: 693-709.

Whiticar, M.J. 1999. Carbon and hydrogen isotope systematics of bacterial formation and oxidation of methane. *Chem. Geol.* **161**: 291-314.

Winfrey, M.R. und Zeikus, J.G. 1977. Association of hydrogen metabolism with methanogenesis in Lake Mendota Sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **33**: 312-318.

Winfrey, M.R. und Zeikus, J.G. 1979 a. Anaerobic metabolism of immediate methane precursors in Lake Mendota. *Appl. Environ. Microbiol.* **37**: 244-253.

Winfrey, M.R. und Zeikus, J.G. 1979 b. Microbial methanogenesis and acetate metabolism in a meromictic lake. *Appl. Environ. Microbiol.* **37**: 213-221.

Woltemate, I., Whiticar, M.J. und Schoell, M. 1984. Carbon and hydrogen isotopic composition of bacterial methane in a shallow freshwater lake. *Limnol. Oceanogr.* **29**: 985-992.

Zaid, I., Grusenmeyer, S. und Verstraete, W. 1986. Sulfate reduction relative to methane production in high-rate anaerobic digestion: technical aspects. *Appl. Environ. Microbiol.* **51**: 572-579.

Zehnder, A.J.B. 1978. Ecology of methane formation. *Water Pol. Microbiol.* **2**: 349-376.

Zehnder, A.J.B. und Brock, T.D. 1979. Methane formation and methane oxidation by methanogenic bacteria. *J. of Bacteriology* **137**: 420-432.

Zehnder, A.J.B. und Stumm, W. 1988. Geochemistry and biogeochemistry of anaerobic habitats - In: Zehnder, A.J.B. (Hrsg.): *Biology of anaerobic microorganisms*. Wiley Interscience Publications, New York: 1-38.

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

Zinder, S.H. 1994. Syntrophic acetate oxidation and "reversible acetogenesis" - In: Drake, H.L. (Hrsg.): *Acetogenesis*, Seite 386-415, Chapman & Hall., New York.

Zinder, S.H. und Koch, M. 1984. Non-aceticlastic methanogenesis from acetate: Acetate oxidation by a thermophilic syntrophic coculture. *Arch. Microbiol.* **138**: 263-272.

Anhang

Archiv of Hydrobiology, In press 2000

Methane production in eutrophic Lake Plußsee: seasonal change, temperature effect and metabolic processes in the profundal sediment

Bernhard Nüsslein, Ralf Conrad¹

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

¹Corresponding author:

Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie

Karl-von-Frisch-Str.

D-35043 Marburg, Germany

Tel.: +49 (6421) 178 801

Fax.: +49 (6421) 178 809

e-mail: conrad@mail.uni-marburg.de

Abstract:

Rates of CH₄ production in the profundal sediment of Lake Plußsee were higher during the summer than during fall, and fairly well explained the CH₄ concentration that accumulated in the hypolimnion during summer stratification. Oxidation of CH₄ at the oxycline played only a marginal role in the seasonal CH₄ cycle. Although the sediment temperature (4°C) did not change with season, CH₄ production rates could be stimulated by incubation at increased temperature (25°C). At both 4°C and 25°C, thermodynamic conditions in the sediment allowed exergonic production of CH₄ from either acetate, H₂/CO₂ or methanol. Inhibition of methanogenesis by 2-bromoethane sulfonic acid (BES) resulted in the accumulation of acetate, but was only detectable at 25°C. Inhibition of acetoclastic methanogenesis by methyl fluoride resulted in partial inhibition of CH₄ and was only detectable at 25°C. Incorporation of radioactive bicarbonate into CH₄ was also only detectable at 25°C and then accounted for about 25-42% of total CH₄ production. [2-¹⁴C]acetate was converted to ¹⁴CH₄ with turnover times of about 24 and 97 h at 25°C and 4°C, respectively, but accounted for only 4-9% of total CH₄ production. The turnover times of radioactive methanol were even larger (about 96 at 25°C and 153 h at 4°C) and accounted for <1% of total CH₄ production. Hence, these processes could account for a larger percentage of CH₄ production only if taking place in sediment microniches that did not fully equilibrate with the pore water. Production of CH₄ at 25°C was stimulated by addition of pectin, acetate, methanol or H₂, but at 4°C, it was only stimulated by H₂. The stable carbon isotopic composition of CH₄ and CO₂ in the water column and in incubated sediment slurries indicated that CH₄ production was dominated by acetoclastic methanogenesis, with H₂/CO₂-dependent methanogenesis contributing more at 25°C than 4°C. In conclusion, the data are consistent with the assumption that CH₄ production at in-situ temperature (4°C) was due to acetoclastic methanogenesis tightly coupled to acetate production, whereas it was due to both acetoclastic and H₂/CO₂-dependent methanogenesis at 25°C. This assumption is also consistent with the observation that the sediment fermented added glucose or pectin to acetate as a major product.

Introduction

In lake sediments methanogenesis is one of the most important terminal processes in the anaerobic degradation of organic material. Rates of methanogenesis in lake sediments have been measured at many different places (CAPONE & KIENE 1988; DENHEYER & KALFF 1998). However, the fermentation patterns of organic matter degradation and the immediate precursors of methanogenesis have not been studied so frequently (references in CONRAD 1999). In many of these investigations it was found that CH₄ is produced from acetate and H₂/CO₂ in a relation of 2:1 as theoretically expected from known fermentation pathways of organic matter degradation (CAPPENBERG 1974; CAPPENBERG & PRINS 1974; IVANOV et al. 1976; WINFREY & ZEIKUS 1979; LOVLEY & KLUG 1982; KUIVILA et al. 1989). In other lake sediments CH₄ is almost exclusively produced from acetate indicating that degradation of organic matter is dominated by the homoacetogenic pathway (PHELPS & ZEIKUS 1984; SCHULZ & CONRAD 1996). However, there are also reports which claim that CH₄ is mainly produced from H₂/CO₂ (IVANOV et al. 1976; JONES et al. 1982; GALCHENKO et al. 1994; NAMSARAEV et al. 1995). These observations can only be understood theoretically, if the degradation of organic matter is not in balance and acetate accumulates temporarily (CONRAD 1999). Therefore, the methanogenic degradation process has to be studied over the season.

Profundal lake sediments are often permanently cold. Nevertheless, the temperature optimum of CH₄ production in lake sediments has always been found to be higher than the in-situ temperature (ZEIKUS & WINFREY 1976; SCHULZ et al. 1997; NOZHEVNIKOVA et al. 1997). SCHULZ & CONRAD (1996) observed a shift in the anaerobic degradation pattern of organic matter when the temperature of Lake Constance sediment was increased from 4 to 20°C, resulting in an increased contribution of H₂/CO₂ to CH₄ production. The authors hypothesized that at low temperature organic matter degradation may be dominated by homoacetogenesis followed by acetate-dependent methanogenesis. At higher temperature, on the other hand, fermentation and syntrophic oxidation of fatty acids, followed by methanogenesis from acetate and H₂/CO₂ in a relation of about 2:1, would become increasingly important. This hypothesis is in agreement with a similar shift of degradation pattern in anoxic rice field soil (CHIN & CONRAD 1995) and with the observation that enrichment cultures on H₂/CO₂ usually result in the dominance of chemolithotrophic homoacetogens at low temperatures and of methanogens at high temperatures (CONRAD et al. 1989; KOTSYURBENKO et al. 1993;

NOZHEVNIKOVA et al. 1994). However, a systematic study on a lake sediment other than Lake Constance has so far not been done.

Our studies were conducted at Lake Plußsee. Lake Plußsee is a small dimictic eutrophic lake, situated in the north of Germany near Plön, and its microbial ecology has intensively been studied since 1965 (OVERBECK and CHROST 1994). Lake Plußsee is surrounded by forest, which provides a high input of organic material and results in the development of an anoxic hypolimnion during the summer. The sediment of the deepest part of the lake is permanently anoxic at constant temperatures of 4 to 5°C (OVERBECK and CHROST 1994). Little is known about anaerobic processes in the lake sediment. Methane production in the sediment of Lake Plußsee has briefly been studied by NAGUIB (1982; 1988) who observed that CH₄ production is stimulated by the addition of acetate, peptone and methanol. However, the annual change of CH₄ production, the temperature dependence, the precursors of methanogenesis and the fermentation patterns of organic matter degradation have not yet been studied.

Therefore, we determined the annual methane flux in Lake Plußsee, taking into consideration not only the contribution of acetate, methanol and H₂ to the methanogenic process, but also the effect of low and high temperatures. In addition, we studied the potential effects of addition of various substrates on CH₄ production in the sediment of Lake Plußsee.

Materials and Methods

Study site and sampling.

Lake Plußsee is a small eutrophic lake located in the north of Germany near Plön. The main characteristics of Lake Plußsee are summarized in Table 1.

Sediment samples were taken during 1997 to 1999 from the deepest part of the lake, i.e. at 28 m depth using an Eckman dredge. After sampling, the upper 10 cm of the sediment were placed into air-tight bottles without gas headspace and stored at 4°C. Vertical profiles of the water column were taken using a Ruttner sampler. Water samples were collected from just above the deepest part of the lake, as well as from every meter of the water column. Temperature, oxygen concentration and pH in the vertical water column were monitored using standard instruments (WTW, Weilheim, Germany). The other measurements and

experiments that were conducted with the sediment and water samples obtained at different dates are summarized in Table 2.

Concentrations of CH₄ dissolved in the water were determined by injecting a 10-ml water sample into a 50-ml serum bottle which had been flushed with CH₄-free N₂. Liquid and gas phase were equilibrated at 25°C by heavy manual shaking. Aliquots (0.1 ml) of the gas head space were then analyzed for CH₄, CO₂, d¹³CH₄ and d¹³CO₂.

Vertical diffusion flux (F) of CH₄ in the water column was assumed to follow Fick's first law

$$F = D_e (\Delta C / \Delta z) \quad (1)$$

with D_e = effective diffusion coefficient of CH₄ in water and ΔC/Δz = vertical concentration gradient of CH₄ in the water column. ΔC/Δz was calculated from linear regression of the measured methane concentrations (C) with depth (z). F was determined from the CH₄ production rate in the profundal sediment at the day of sampling. D_e was then calculated from equation (1).

Incubation experiments

Sediment slurries were prepared from 10 ml sediment (0-10 cm depth) plus 10 ml anoxic distilled water in 50-ml serum bottles which were closed with butyl rubber stoppers. In order to remove all dissolved CH₄, the bottles were ten times evacuated and flushed with N₂, then shaken at 120 rpm for one hour in the dark, and then again evacuated, flushed with N₂ and pressurized to 1.4 bar. The bottles were incubated in triplicate at both 4 and 25°C, and the mixing ratios of CH₄, CO₂ and H₂ in the gas phase were repeatedly measured by taking gas samples (0.1 ml) with gas-tight syringes. Methane production rates were then determined from linear regression of CH₄ against incubation time and expressed in μmol CH₄ per hour and per cm³ of undiluted sediment. Gas samples were also analyzed for ¹³CH₄ and ¹³CO₂ at the end of the incubation. Liquid samples (2 ml) were taken with syringes, the porewater was recovered by centrifugation at 4°C at 12,000 × g for 10 min. The porewater was stored frozen (-25°C) until analysis.

For inhibition of acetoclastic methanogenesis (FRENZEL & BOSSE 1996; JANSSEN & FRENZEL 1997) CH₃F (methyl fluoride) was injected to a final-concentration of 1% (analyzed by GC) in the gas phase. For inhibition of total methanogenesis 2-bromoethane sulfonic acid (BES) or chloroform (CHCl₃) were applied at a final concentration of 10 mM and 100 μM, respectively. To stimulate the methanogenic populations, acetate, formate or methanol were added to a

final concentration of 0.75 - 1 mM, or H₂ was injected into the headspace to a final mixing ratio of 4% (v/v). To stimulate the microbial community degrading organic matter, 10 mM glucose

$$f_{H_2} = SR_{CH_4} / SR_{CO_2} \quad (3)$$

The turnover time (T_t) of [2- ^{14}C]acetate and [^{14}C]methanol was calculated from the logarithmic transformation with time into $^{14}CH_4$ plus $^{14}CO_2$ (PHELPS & ZEIKUS 1984). We assumed that the maximum value of $^{14}CH_4$ and $^{14}CO_2$ produced was equivalent to 100% of the acetate or methanol available to microorganisms, and thus

$$T_t = t / \ln \left(1 - \frac{dpm \text{ of } ^{14}CO_2 + ^{14}CH_4}{\text{Maximum dpm of } ^{14}CO_2 + ^{14}CH_4} \right) \quad (4)$$

The turnover rates of acetate (v_{Ac}) and methanol (v_{Me}) were determined from the acetate (C_{Ac}) and methanol (C_{Me}) concentrations in the sediment slurries by using

$$v = C / T_t \quad (5)$$

The rates of CH_4 production from acetate (P_{Ac}) and methanol (P_{Me}) were calculated from the respective turnover rates by correcting for respiratory index

$$P = v (1 - RI) \quad (6)$$

Analytical techniques

The non-radioactive gases were analyzed as described by CONRAD et al. (1989). CH_4 and CO_2 were analyzed by gas chromatography (GC) using a flame ionization detector (Shimadzu GC 8A, Japan). CO_2 was determined after conversion to CH_4 with a methanizer (Ni-Catalyst at 350°C; Chrompak, Middelburg, The Netherlands). H_2 was determined in a RGD2 reduction gas detector. $^{14}CH_4$ and $^{14}CO_2$ were analyzed in a gas chromatograph equipped with a methanizer, flame ionization detector and RAGA radioactivity gas proportional counter (Raytest, Straubenhardt, Germany) (CONRAD et al. 1989).

The dissolved organic acids (lactate, formate, acetate, propionate, butyrate) were analyzed by high pressure liquid chromatography (Sykam, Gauting, Germany) with a refraction index detector (Schambeck, Bad Honnef, Germany) and a UV-detector (Linear, USA). The detection limits were 550 μM (KRUMBÖCK & CONRAD 1991). To determine lower concentrations of these fatty acids in porewater, the porewater was first concentrated by freeze-drying (Alpha 1-4, Christ, Osterode, Germany) and then analyzed by HPLC. Methanol was also detected in

the HPLC, but only at >500 μM . Therefore, methanol in porewater was also analyzed in a gas chromatograph (CHIN et al. 1998) with a detection limit of 50 μM .

Isotopic analysis in gas samples was performed using a gas chromatograph combustion isotope ratio mass spectrometry (GCC-IRMS) system purchased from Finnigan (Thermoquest, Bremen, Germany). The principle operation was described (BRAND 1996, SUGIMOTO et al. 1991). The isotopes were detected in a Finnigan MAT delta plus IRMS. The CH_4 and CO_2 in the gas samples (10-400 μl) were separated in a Hewlett Packard 6890 gas chromatograph operating with a Pora Plot Q column (27.5 m length; 0.32 mm i.d.; 10 μm film thickness; Chrompack, Frankfurt, Germany) at 25°C and He (99.996% purity; 2.6 ml/min) as carrier gas. The separated gases were then converted to CO_2 in the Finnigan Standard GC Combustion Interface III and transferred into the IRMS. The working standard was CO_2 gas (99.998% purity; Messer-Griessheim, Düsseldorf, Germany) calibrated against Pee Dee Belemnite carbonate. The isotopic ratios were expressed in the delta notation: $\delta^{13}\text{C} = 10^3 (R_{\text{sa}}/R_{\text{st}} - 1)$ with $R = {}^{13}\text{C}/{}^{12}\text{C}$ of sample (sa) and standard (st), respectively. The precision of repeated analysis was $\pm 0.2\text{‰}$ when 1.3 nmol CH_4 was injected. The fractionation factor a_{C} for CH_4 formation from CO_2 was approximated by (WHITICAR et al. 1986):

$$a_{\text{C}} = (\delta^{13}\text{C}_{\text{CO}_2} + 10^3) / (\delta^{13}\text{C}_{\text{CH}_4} + 10^3) \quad (8)$$

Results

Seasonal pattern of CH_4 production

Sediment slurries that were collected at different times of the year were incubated at 4 and 25°C to examine differences in methanogenesis between the in-situ temperature and higher temperatures. A typical incubation experiment is shown in Fig. 1 for sediment taken in September 1998. At 25°C, the CH_4 concentration increased linearly with time during the entire incubation period (Fig. 1A). The H_2 partial pressure increased and then varied between 0.2 and 0.6 Pa (Fig. 1A). At 4°C, CH_4 first increased linearly, then the CH_4 production rate leveled off (Fig. 1B). The final concentration of CH_4 at 4°C was 10 times lower than at 25°C. The H_2 partial pressures at 25°C were similar than at 4°C (Fig. 1B).

At other times of the year, the rates of CH_4 production were also much higher at 25°C than at 4°C (Fig. 2). The rates of CH_4 production were highest during the summer months and

decreased in autumn (Fig. 2). At the in-situ temperature (4°C), CH₄ production increased from June to August and decreased at the end of September (Fig. 2). The CH₄ flux from the sediment into the water was calculated by assuming that CH₄ was only produced in the upper 10-cm layer of the profundal sediment. The fluxes ranged from 0,89 pmol cm⁻² s⁻¹ in late September to 8.27 pmol cm⁻² s⁻¹ in August (Table 4).

The vertical profiles of CH₄ concentrations in the water column also exhibited a seasonal trend with values increasing from August to October and being lowest in January (Fig. 3). The oxycline ranged between 7 m depth in summer to 20 m depth in January (data not shown). In Fig. 3, the oxycline coincides with the depth at which CH₄ concentrations reach zero, demonstrating that virtually all of the produced CH₄ was oxidized at the oxycline. The vertical CH₄ profile in the water column (Fig. 3) was used to calculate the CH₄ concentration gradient with depth ($\partial c/\partial z$) and the total amount of CH₄ (M_{CH_4}) present in the water column over an area of 1 cm². The values of $\partial c/\partial z$ ranged from 0.07 nmol/cm⁴ in January to 0.12 nmol/cm⁴ in October (Table 4). The values of M_{CH_4} ranged from 63 μmol/cm² in January to 320 μmol/cm² in October (Table 4).

Porewater concentrations, thermodynamics and stable isotope fractionation

Direct analysis of sediment porewater by HPLC failed to detect fatty acids like acetate, propionate, butyrate, or methanol. After reduction of the volume of the porewater by freeze-drying acetate was detected at a concentration of 3.1 - 3.6 nmol/cm³ sediment. Only in November 1999, acetate was detected at a concentration of 8 μM. However, methanol was not detectable and thus was <25 nmol/cm³ sediment.

Thermodynamic calculations were done with data obtained with slurries of different samples taken in the period of June to October 1998 (Table 3). Methanogenesis from acetate exhibited ΔG values lower than -35 kJ/mol CH₄, i.e. was clearly exergonic, both at 4 and 25°C. Methanogenesis from Methanol was even more exergonic (ΔG > -94 kJ/mol CH₄). Methanogenesis from H₂/CO₂ was also exergonic, although ΔG values were lower at 4 than at 25°C (Table 3). Homoacetogenesis from H₂/CO₂, on the other hand, was always endergonic with positive ΔG values (Table 3).

Fractionation of stable isotopes in CO₂ and CH₄ was determined in water samples adjacent to the sediment (sampled on 23 Sep 98; 27 Oct 98; 26 Jan 99) and in incubated sediment slurries (same sampling dates). The CH₄ and CO₂ in the water adjacent to the sediment were

both more depleted in ^{13}C than the gases that were analyzed in the incubated sediment slurries (Table 5), but the calculation of an apparent isotopic fractionation factor resulted in a similar value of about 1.048 to 1.052 at in-situ temperature (4°C). The apparent fractionation factor was higher ($\alpha = 1.057$) in the sediment slurry incubated at 25°C than at 4°C , suggesting an increased contribution of CO_2 reduction to total CH_4 production.

Precursors of methanogenesis

To determine which precursors were used by the methanogens we conducted inhibition experiments. Both BES and chloroform caused complete inhibition of CH_4 production at 4°C and 25°C . Accumulation of acetate but not of H_2 or any other compound was observed at 25°C in the presence of BES. Unfortunately, acetate accumulation could only be detected at 25°C . At 4°C , CH_4 production rates were too low to detect the equivalent amounts of acetate. Methyl fluoride is described as a rather specific inhibitor for acetoclastic methanogenesis (FRENZEL & BOSSE 1996; JANSSEN & FRENZEL 1997; CONRAD & KLOSE 1999). A typical experiment with CH_3F at 25°C is shown in Fig. 4. Addition of CH_3F resulted only in partial inhibition (about 30% residual activity) of CH_4 production, suggesting the operation of H_2/CO_2 -dependent methanogenesis that was not inhibited by CH_3F . Addition of CH_3F also resulted in the accumulation of acetate at amounts that were fairly equivalent to the inhibited CH_4 ($104 \pm 100\%$; mean \pm SD of $n=2$). The H_2 concentrations in the slurry samples showed no difference between the uninhibited and the inhibited treatment (data not shown).

The contribution of H_2/CO_2 to total CH_4 production at 25°C was determined by measuring the production of $^{14}\text{CH}_4$ from $^{14}\text{CO}_2$ (Fig. 5). After addition of $\text{H}^{14}\text{CO}_3^-$ to the sediment slurry, the specific radioactivity of $^{14}\text{CO}_2$ rapidly increased due to equilibration of dissolved and gaseous CO_2 , and then decreased due to the formation of non-radioactive CO_2 by decomposition of organic matter. Radioactive CH_4 became detectable after about 150 h of incubation. The specific radioactivity of $^{14}\text{CH}_4$ stabilized about 150 h later. The fraction of CH_4 that was produced from H_2/CO_2 (f_{H_2}) at 25°C ranged then between 0.25 and 0.42 (Fig. 5). At 4°C , on the other hand, addition of $\text{H}^{14}\text{CO}_3^-$ did not result in the formation of detectable amounts of $^{14}\text{CH}_4$ during an incubation period of 40 days (960 h), although a $f_{\text{H}_2} = 5\%$ should have been detectable. Addition of [^{14}C]formate to the profundal sediment slurries resulted only in the formation of $^{14}\text{CO}_2$ but not of $^{14}\text{CH}_4$, both at 4°C and 25°C (data not shown).

On the other hand, the conversion of [$2\text{-}^{14}\text{C}$]acetate to $^{14}\text{CH}_4$ was detectable at both 25°C and at 4°C . [$2\text{-}^{14}\text{C}$]acetate was completely degraded after two days at 25°C (Fig. 6A) and 12 days

at 4°C (Fig. 6B). However, only about 30% of the [2-¹⁴C]acetate was converted to gaseous products, the remainder was largely recovered in the sediment (about 50%), indicating that it was adsorbed to sediment matter and thus not available to acetate-consuming microorganisms. The respiratory indices (RI) at the end of incubation were <0.2 (Table 6), i.e. slightly higher than the value (RI = 0) expected from the stoichiometric conversion of the methyl group of acetate to CH₄. The turnover times of [2-¹⁴C]acetate were 3 times faster at 25°C than at 4°C (Table 6). However, the rates of acetate-dependent CH₄ production (P_{Ac}) that were calculated from the turnover of [2-¹⁴C]acetate were only 49% of the total CH₄ production rates at both 4 and 25°C.

At 4°C, addition of [1-¹⁴C]acetate to the profundal sediment resulted in production of ¹⁴CO₂ only. Even after a long incubation (40 days), production of ¹⁴CH₄ was not detectable (data not shown). At 25°C, on the other hand, production of ¹⁴CH₄ became detectable after 16 days (384 h), after [1-¹⁴C]acetate had first been converted to ¹⁴CO₂ similarly as at 4°C (Fig. 7). It is likely that at 25°C [1-¹⁴C]acetate was first converted to ¹⁴CO₂ which then was further converted to ¹⁴CH₄.

Addition of [¹⁴C]methanol also resulted in the production of ¹⁴CH₄ and ¹⁴CO₂. However, Only a relatively small fraction (25% and 8% at 25 and 4°C, respectively) of the added [¹⁴C]methanol was converted to gaseous products (Table 6), the remainder was recovered in the sediment and was presumably adsorbed to sediment particles or assimilated into microbial biomass. Radioactive acetate was not detected at the end of incubation. The RI values (0.46-0.67) were higher than the value (RI = 0.25) expected from the stoichiometric conversion of 4 methanol to 3 CH₄ plus 1 CO₂, indicating that a proportionally larger fraction of the methanol was oxidized. The transformation rates of methanol to CH₄ were small compared to the rates of CH₄ production accounting for <1% at 4°C and 11% at 25°C (Table 6).

Potential stimulation of methanogenesis

A number of methanogenic substrates were tested for potential stimulation of CH₄ production in profundal sediment slurries at 4 and 25°C. At 25°C, acetate, methanol and H₂, but not formate, stimulated CH₄ production (Table 7). Hydrogen and acetate stimulated CH₄ production the most. At 4°C, on the other hand, only H₂ and formate stimulated CH₄ production (Table 7). Hydrogen stimulated CH₄ production, when injected into a N₂ headspace to give a mixing ratio of 4%. However, when the sediment slurries were incubated under a

headspace of H_2/CO_2 (80%/20%), CH_4 production was not stimulated at either 4 or 25°C. Instead, acetate and butyrate accumulated and the pH decreased to pH 4.5 (data not shown). Besides direct methanogenic precursors, we also applied more complex substrates (glucose, pectin) to test for potential stimulation of fermentation processes followed by methanogenesis. Glucose was added to a final concentration of 10 mM. During the incubation time of 10 days CH_4 production was not stimulated at either 4 or 25°C, probably since the pH dropped to values below pH 5 due to fermentation of glucose. Glucose was fermented in the sediment slurries mainly to acetate, butyrate and H_2 both at 25°C (Fig. 8A) and 4°C (Fig. 8B). Production of CO_2 was also stimulated by glucose at both temperatures (data not shown). At 25°C, H_2 accumulated only transiently; the maximum H_2 partial pressures were about 6500 times higher than in the unamended control slurries. Mass balance calculations at the end of the incubation showed that 70% and 100% of the added glucose carbon and 75% and 68% of the available electrons were recovered as product at 25 and 4°C, respectively.

Pectin was added to a final concentration of 10 mg per cm^3 slurry. Pectin is an important organic substrate in lake sediments. In Lake Mendota sediment it is methanogenically degraded via butyrate and acetate (SCHINK & ZEIKUS 1982). Addition of pectin stimulated CH_4 production at 25°C to a rate of $3.8 \text{ nmol h}^{-1} \text{ cm}^{-3}$, i.e. about 3-fold compared to the unamended control ($1.2 \text{ nmol h}^{-1} \text{ cm}^{-3}$). At 4°C, on the other hand, CH_4 production was not stimulated by addition of pectin. The H_2 partial pressures were not affected by addition of pectin, both at 4 and 25°C (data not shown). However, CO_2 production was stimulated by a factor of about 7.5 (data not shown). Acetate was the main product of pectin degradation at both temperatures (Fig. 9). Propionate, butyrate and formate were only produced in small amounts. Methanol was not detected, i.e. $< 250 \text{ nmol/cm}^3$ slurry. Mass balance calculations at the end of the incubation showed that 75% and 66% of the added pectin carbon (using the molecular weight of β -galacturonic acid) and 89% and 63% of the available electrons were recovered as product at 25 and 4°C, respectively.

Discussion

Seasonality of CH_4 production

Production of CH_4 was stimulated when the temperature was increased from 4 to 25°C. This result confirms earlier observations in other aquatic sediments (ZEIKUS & WINFREY 1976;

SCHULZ et al. 1997; NOZHEVNIKOVA et al. 1997), i.e. that the CH₄-producing microbial communities have a temperature optimum that is far higher than the temperature that they ever will experience in-situ. Presently, it is unknown why this is the case. Our data demonstrate a seasonal change of the CH₄ production rate in the sediment of Lake Plußsee. However, temperature increase was not the reason for the observed increase of CH₄ production during summer, since the temperature of the profundal sediment was constantly low at 4-5°C throughout the year and thus could itself not serve as a seasonal signal. We therefore assume that the observed seasonal change was triggered by the input of organic matter into the sediment. SCHULZ & CONRAD (1995) demonstrated that sedimentation of algal material can indeed trigger increased CH₄ production rates in the profundal and permanently cold sediment of deep Lake Constance. In more shallow lakes, on the other hand, the higher rates of CH₄ production in the sediment during the summer is probably due to both increased input of organic matter and increased temperature (MOLONGOSKI & KLUG 1980; SINKE et al. 1992). The combined effects of temperature and organic matter may result in larger amplitudes of the seasonal change such as observed in shallow eutrophic Lake Loosdrecht (SINKE et al. 1992).

Methane cycling in Lake Plußsee

The CH₄ production rates in eutrophic Lake Plußsee were not much higher (about 1.2 nmol h⁻¹ cm⁻³ sediment) than in oligotrophic Lake Constance (0.65 nmol h⁻¹ cm⁻³; FRENZEL et al. 1990). Other eutrophic lakes, on the other hand, showed much higher CH₄ production rates at in-situ temperature than Lake Plußsee, e.g. Knaack Lake (2.3 - 6.4 nmol h⁻¹ cm⁻³; CONRAD et al. 1987; PHELPS & ZEIKUS 1984), Lake Mendota (18 - 47 nmol h⁻¹ cm⁻³; PHELPS & ZEIKUS 1985), Lake Vechten (12 nmol h⁻¹ cm⁻³; DEGRAAF et al. 1996) and Lake Loosdrecht (<7 nmol h⁻¹ cm⁻³; SINKE et al. 1992). However, mesotrophic Lake Washington (<0.17 nmol h⁻¹ cm⁻³; KUIVILA et al. 1988) and mesotrophic Lake Kizaki (0.28 - 1.9 nmol h⁻¹ cm⁻³; TAKII et al. 1997) exhibited lower CH₄ production rates than eutrophic Lake Plußsee. The reason, why CH₄ production in the sediment in Lake Plußsee is relatively low, is unknown, but may be caused by the composition of the organic matter (e.g., leaves from the surrounding forests) that reaches the sediment.

The concentration profile of CH₄ in the water column indicates that the CH₄ is oxidized at the oxycline similarly as reported for many other lakes (RUDD & TAYLOR 1980). The total CH₄

production during the summer stratification is thus balanced by CH₄ oxidation at the oxycline plus accumulation of CH₄ in the hypolimnion. Indeed, the seasonal change of CH₄ production in the sediment resulted in a seasonal change in the concentrations of dissolved CH₄ in the water column of Lake Plußsee. The total annual CH₄ production in the upper 10-cm sediment layer determined from the integral of the seasonally changing CH₄ production rates (Fig. 2) was on the order of 50-100 μmol/cm². The total mass of CH₄ which accumulated between January and October in the hypolimnion was on the order of 250 μmol/cm² (Table 4). Hence, the CH₄ produced in the sediment was less than the CH₄ accumulated in the hypolimnion. This observation is in agreement with results obtained in Lake Loosdrecht where the CH₄ concentrations in the water column were much higher than calculated from rates in the sediment slurry incubations (SINKE et al. 1992). It is likely, that the effective sediment layer in which CH₄ is produced is deeper than the assumed 10 cm. In addition, CH₄ may be laterally advected (RUDD & HAMILTON 1978). On the other hand, some of the produced CH₄ may have been lost by ebullition. By and large, however, the CH₄ production rates in the sediment explained the CH₄ concentrations in the hypolimnion fairly well.

Most of the CH₄ that has accumulated in the hypolimnion during the summer is probably removed during the fall turnover. Oxidation of CH₄ at the oxycline during stratification, on the other hand, seemed to contribute only little to the CH₄ budget in the lake. This is in contrast to observations in eutrophic Canadian shield lakes and in eutrophic Lake Mendota where CH₄ oxidation during the stratification period contributes to the CH₄ budget as much as CH₄ accumulation (RUDD & HAMILTON 1978; FALLON et al. 1980). The residence time (τ) of CH₄ in the water column of Lake Plußsee, which was calculated ($\tau = M/F$) from the total amount (M_{CH_4}) of CH₄ present in the water column (about 200 μmol/cm² for August to September; Table 4) and the flux (F) of CH₄ out of the sediment (about 70-700 nmol d⁻¹ cm⁻² for August to September; Table 4), was on the order of 300 to 3000 daysew (forut 72 Tablx0Nartch319.54oearsD /F2 k

thus 3-4 orders of magnitude higher than the molecular diffusion coefficient of CH₄ in water at 4°C of 0.95×10^{-5} cm²/s (LERMAN, 1979) and were on the same order as the thermal diffusion coefficients (0.014 cm²/s) determined for Lake Plußsee (OVERBECK & CHROST 1994). A similar effective CH₄ diffusivity was also reported for the hypolimnion of Lake Mendota (FALLON et al. 1980) and of other lakes (QUAY et al. 1980).

Processes involved in CH₄ production

The CH₄ production processes were characterized by thermodynamic analysis, radiotracer experiments, inhibition of methanogens, stimulation with additional substrates and stable isotope analysis of the produced CH₄. Different results were obtained with sediment incubated at in-situ (4°C) and at elevated temperature (25°C).

Acetotrophic methanogenesis was active at both 4 and 25°C as demonstrated by the conversion of [2-¹⁴C]acetate to largely ¹⁴CH₄. The low amounts of ¹⁴CO₂ produced indicated that methanogenesis was the exclusive acetate consumption process. Despite the low acetate concentrations in the sediment, the process was clearly exergonic with ΔG values of around -35 kJ/mol CH₄ (Table 3). Similar values have been observed in Lake Constance sediment (SCHULZ & CONRAD 1996) and in methanogenic soils (PETERS & CONRAD 1996; YAO & CONRAD 1999). The turnover times of acetate were shorter at 25°C (30 h) than at 4°C (100 h). However, the turnover times were much longer than in other eutrophic lakes, e.g. Lake Mendota (4.5 h at 10°C; WINFREY & ZEIKUS 1979) or Lake Vechten (5.6 h at 10°C; DEGRAAF et al. 1996). Because of the high acetate turnover times and the low acetate concentrations, acetate turnover accounted for only 4-9% of the rates of CH₄ production (Table 6). Therefore, CH₄ must either have been produced from compounds other than acetate, or the true rates of acetate turnover rates have been underestimated. Underestimation is possible, if acetate is cycled within microniches with much higher effective acetate concentrations. In this context it is interesting that CH₄ production was only stimulated by acetate addition at 25°C, but not at in-situ temperature (Table 7), indicating that the methanogens were saturated with acetate at 4°C. Hence, it is not unlikely that acetate was cycled directly between acetate producers and methanogens.

Next to acetate, H₂ is an important methanogenic substrate in anoxic environments. Thermodynamic conditions were favorable for H₂/CO₂-dependent methanogenesis in Lake Plußsee sediment, especially at 4°C (Table 3). At 25°C, ΔG values were >-18 kJ/mol CH₄ and thus more positive than usually observed in environments where H₂/CO₂ is converted to CH₄

(CONRAD 1999). On the other hand, radioactive CO_2 was only converted to $^{14}\text{CH}_4$ at 25°C but not at 4°C . Even $[1\text{-}^{14}\text{C}]\text{acetate}$ which was first converted to $^{14}\text{CO}_2$ allowed some production of $^{14}\text{CH}_4$, however, only at 25°C . Our results indicate that approximately 30-40% of the total CH_4 was produced from H_2/CO_2 at 25°C . Such a proportion is theoretically expected when polysaccharides are degraded by fermentation, followed by syntrophic fatty acid oxidation and H_2 -dependent and acetotrophic methanogenesis (CONRAD 1999). At the low in-situ temperatures of Lake Plußsee sediment, on the other hand, H_2 -dependent methanogenesis was apparently not of importance. This observation is in contrast to methanogenic peat, where H_2 was reported to be the exclusive methanogenic substrate, especially at the low temperatures during the winter (AVERY et al. 1999; LANSDOWN et al. 1992), and is also in contrast to other lake sediments where conversion of $^{14}\text{CO}_2$ to $^{14}\text{CH}_4$ is detected at low in-situ temperatures (IVANOV et al. 1976; JONES et al. 1982; GALCHENKO et al. 1994; NAMSARAEV et al. 1995). Despite the fact that H_2 -dependent methanogenesis was thermodynamically possible (Table 3), the lack of a detectable activity in Lake Plußsee sediment at 4°C was most probably caused by H_2 limitation, since CH_4 production was greatly stimulated by addition of H_2 both at 4 and 25°C .

Other methanogenic substrates, such as methanol and formate, are unlikely precursors of CH_4 production in Lake Plußsee sediment. The turnover rates of $[^{14}\text{C}]\text{methanol}$ were too small to account for the measured CH_4 production rates, especially at 4°C . Addition of methanol stimulated CH_4 production only at 25°C but decreased CH_4 production at 4°C . This result is in agreement with the earlier studies of NAGUIB (1982; 1988) who reported stimulation of CH_4 production by methanol, but measured at elevated temperature (27°C). Methanol could not be detected in Lake Plußsee sediment, i.e. $<25 \text{ nmol/cm}^3$. Nevertheless, turnover times were larger than 96 h. Even in the presence of pectin, methanol was not formed, although the formation of up to one molecule of methanol per monomer of pectin would be expected (SCHINK & ZEIKUS 1982). Therefore, we do not believe that methanol was an important precursor of methanogenesis under in-situ conditions, although the potential for methanol-dependent methanogenesis was apparent at elevated temperature (NAGUIB 1982; 1988).

Formate was detected as a product of glucose and pectin fermentation, especially at 25°C . Formate actually did stimulate CH_4 production at 4°C , but addition of $[^{14}\text{C}]\text{formate}$ only resulted in the production of $^{14}\text{CO}_2$ which was not further converted to $^{14}\text{CH}_4$. Therefore, it is unlikely that a significant percentage of CH_4 was produced from formate. Furthermore, formate and H_2/CO_2 equilibrate in cultures of anaerobic microorganisms and in sediments

(PETERS et al. 1999; DEGRAAF & CAPPENBERG 1996), so that formate-dependent methanogenesis is more or less equivalent to H_2/CO_2 -dependent methanogenesis.

Hence, we conclude that CH_4 production in Lake Plußsee sediment under in-situ conditions was exclusively due to acetotrophic methanogenesis. The stable isotope signature ($d^{13}CH_4$) of CH_4 and the apparent isotopic fractionation factor between CO_2 and CH_4 is in agreement, but does not prove, this conclusion. Acetotrophic CH_4 production is known to result in a smaller isotopic fractionation than methanogenic reduction of CO_2 (WHITICAR et al. 1986; BLAIR et al. 1993). Therefore, apparent fractionation factors between CO_2 and CH_4 are usually larger and $d^{13}CH_4$ is usually more negative, when CH_4 is produced from CO_2 rather than from acetate. Methanogenesis from methanol would also produce more negative $d^{13}CH_4$ than observed (KRZYCKI et al. 1987; unpublished results). The CH_4 that was produced at 4°C was relatively heavy and the apparent fractionation factor was with about 1.05 in a range which is typical for acetate-dominated methanogenesis (WHITICAR et al. 1986; BLAIR et al. 1993). The fractionation factor slightly increased from 4 to 25°C. Since the isotopic discrimination should decrease with increasing temperature (BLAIR et al. 1993), the higher apparent fractionation factor indicates a larger contribution of CO_2 reduction to methanogenesis at 25 than at 4°C.

Unfortunately, our conclusion that CH_4 in Lake Plußsee sediment at in-situ was mainly produced from acetate, could not be confirmed by inhibition of methanogenesis, since the rates of acetate production were below the detection limit at 4°C. Only at 25°C, we observed accumulation of acetate when CH_4 production was inhibited. The observation that CH_4 production at 25°C was not completely inhibited by methyl fluoride is in agreement with our interpretation that H_2/CO_2 -dependent methanogenesis was active at this temperature.

In general, our observations demonstrate that H_2/CO_2 -dependent methanogenesis was enhanced when the temperature was raised from 4 to 25°C. In this respect, the sediment of Lake Plußsee behaved similarly as the sediment of Lake Constance (SCHULZ & CONRAD 1996) or methanogenic paddy soil (CHIN & CONRAD 1995), and the interpretation of the phenomenon is probably the same. Briefly, at low temperature, methanogens are limited by H_2 which is produced in smaller amounts due to the relative increase of homoacetogenesis compared to other fermentation processes. This change results in reduction of syntrophic degradation processes and in lower production rates of H_2 relative to acetate. At low temperatures, production of fatty acids and H_2 is bypassed by homoacetogenesis. This interpretation is in agreement with the observations that production of acetate and butyrate was stimulated when large amounts of H_2 were added to Lake Plußsee sediment. Under in-situ conditions, on the other hand, even at 25°C, H_2 concentrations were too low to allow

exergonic reduction of CO₂ to acetate. This result is also in agreement with observations in other aquatic systems (CHIN & CONRAD 1995; SCHULZ & CONRAD 1996; HOEHLER et al. 1999). Therefore, homoacetogens must use substrates other than H₂/CO₂, probably sugars. The potential for fermentative production of fatty acids and of H₂ was demonstrated by stimulation experiments with addition of glucose or pectin. However, these experiments only demonstrated potentials. Under in-situ conditions, concentrations of alcohols, fatty acids and even of acetate were too low to be directly detected by HPLC.

Acknowledgements

We thank G. Augustin and P. Witzel (Max-Planck-Institut, Plön) for providing the logistics and for help during sampling at Lake Plußsee, and H.J. Krambeck for supplying data on the lake environment.

References

- AVERY JR., G. B., SHANNON, R. D., WHITE, J. R., MARTENS, C. S. & ALPERIN, M. J. (1999): Effect of seasonal changes in the pathways of methanogenesis on the $\delta^{13}\text{C}$ values of pore water methane in a Michigan peatland. - *Global Biogeochem. Cycles* **13**: 475-484.
- BLAIR, N.E., BOEHME, S.E. & CARTER JR., W.D. (1993): The carbon isotope biogeochemistry of methane production in anoxic sediments: 1. Field observations - In: Oremland, R.S. (ed.): *Biogeochemistry of Global Change*, pp. 574-593, Chapman & Hall, New York.
- BRAND, W.A. (1996): High precision isotope ratio monitoring techniques in mass spectrometry. - *J. Mass Spectrometry* **31**: 225-235.
- CAPONE, D.G. & KIENE, R.P. (1988): Comparison of microbial dynamics in marine and freshwater sediments: contrasts in anaerobic carbon catabolism. - *Limnol. Oceanogr.* **33**: 725-749.
- CAPPENBERG, Th.E. & PRINS, R.A. (1974): Interrelations between sulfate-reducing and methane-producing bacteria in bottom deposits of a fresh-water lake. III. Experiments with ^{14}C -labeled substrates. - *Ant. Leeuwenhoek* **40**: 457-469.
- CAPPENBERG, Th.E. (1974): Interrelations between sulfate-reducing and methane-producing bacteria in bottom deposits of a fresh-water lake. II. Inhibition experiments. - *Ant. Leeuwenhoek* **40**: 297-306.

-
- CHIN, K. J. & CONRAD, R. (1995): Intermediary metabolism in methanogenic paddy soil and the influence of temperature. - FEMS Microbiol. Ecol. **18**: 85-102.
- CHIN, K. J., RAINEY, F. A., JANSSEN, P. H. & CONRAD, R. (1998): Methanogenic degradation of polysaccharides and the characterization of polysaccharolytic clostridia from anoxic rice field soil. - Syst. Appl. Microbiol. **21**: 185-200.
- CONRAD, R. & WETTER, B. (1990): Influence of temperature on energetics of hydrogen metabolism in homoacetogenic, methanogenic, and other anaerobic bacteria. - Arch. Microbiol. **155**: 94-98.
- CONRAD, R. (1999): Contribution of hydrogen to methane production and control of hydrogen concentrations in methanogenic soils and sediments [review]. - FEMS Microbiol. Ecol. **28**: 193-202.
- CONRAD, R., BAK, F., SEITZ, H. J., THEBRATH, B., MAYER, H. P. & SCHÜTZ, H. (1989): Hydrogen turnover by psychrotrophic homoacetogenic and mesophilic methanogenic bacteria in anoxic paddy soil and lake sediment. - FEMS Microbiol. Ecol. **62**: 285-294.
- CONRAD, R., GOODWIN, S. & ZEIKUS, J.G. (1987): Hydrogen metabolism in a mildly acidic lake sediment (Knaack Lake). - FEMS Microbiol. Ecol. **45**: 243-249.
- CONRAD, R. & KLOSE, M. (1999): How specific is the inhibition by methyl fluoride of acetoclastic methanogenesis in anoxic rice field soil? - FEMS Microbiol. Ecol. **30**: 47-56.
- CONRAD, R., MAYER, H. P. & WÜST, M. (1989): Temporal change of gas metabolism by hydrogen-syntrophic methanogenic bacterial associations in anoxic paddy soil. - FEMS Microbiol. Ecol. **62**: 265-274.
- CONRAD, R., SCHINK, B. & PHELPS, T.J. (1986): Thermodynamics of H₂-producing and H₂-consuming metabolic reactions in diverse methanogenic environments under in-situ conditions. - FEMS Microbiol. Ecol. **38**: 353-360.
- DEGRAAF, W. & CAPPENBERG, T. E. (1996): Evidence for isotopic exchange during metabolism of stable- isotope-labeled formate in a methanogenic sediment. - Appl. Environ. Microbiol. **62**: 3535-3537.
- DEGRAAF, W., WELLSBURY, P., PARKES, R. J. & CAPPENBERG, T. E. (1996): Comparison of acetate turnover in methanogenic and sulfate-reducing sediments by radiolabeling and stable isotope labeling and by use of specific inhibitors: Evidence for isotopic exchange. - Appl. Environ. Microbiol. **62**: 772-777.
- DENHEYER, C. & KALFF, J. (1998): Organic matter mineralization rates in sediments - a within- and among-lake study. - Limnol. Oceanogr. **43**: 695-705.

-
- FALLON, R.D., HARRITS, S., HANSON, R.S. & BROCK, T.D. (1980): The role of methane in internal carbon cycling in Lake Mendota during summer stratification. - *Limnol. Oceanogr.* **25**: 357-360.
- FRENZEL, P. & BOSSE, U. (1996): Methyl fluoride, an inhibitor of methane oxidation and methane production. - *FEMS Microbiol. Ecol.* **21**: 25-36.
- FRENZEL, P., THEBRATH, B. & CONRAD, R. (1990): Oxidation of methane in the oxic surface layer of a deep lake sediment (Lake Constance). - *FEMS Microbiol. Ecol.* **73**: 149-158.
- GALCHENKO, V.F. (1994): Sulfate reduction, methane production, and methane oxidation in various water bodies of Bunge Hills Oasis of Antarctica. - *Mikrobiologiya* **63**: 683-698.
- HOEHLER, T. M., ALBERT, D. B., ALPERIN, M. J. & MARTENS, C. S. (1999): Acetogenesis from CO₂ in an anoxic marine sediment. - *Limnol. Oceanogr.* **44**: 662-667.
- IMBODEN, D.M. (1990): Mixing and transport in lakes: mechanisms and ecological relevance - In: Tilzer, M.M. & Serruya, C. (eds.): *Large Lakes. Ecological Structure and Function*, pp. 47-80, Springer, Berlin.
- IVANOV, M.V., BELYAEV, S.S. & LAURINAVICHUS, K.S. (1976): Methods of quantitative investigation of microbiological production and utilization of methane - In: Schlegel, H.G., Gottschalk, G. & Pfennig, N. (eds.): *Microbial Production and Utilization of Gases*, pp. 63-67, E. Goltze, Göttingen.
- JANSSEN, P. H. & FRENZEL, P. (1997): Inhibition of methanogenesis by methyl fluoride - studies of pure and defined mixed cultures of anaerobic bacteria and archaea. - *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 4552-4557.
- JONES, J.G., SIMON, B.M. & GARDENER, S. (1982): Factors affecting methanogenesis and associated anaerobic processes in the sediments of a stratified eutrophic lake. - *J. Gen. Microbiol.* **128**: 1-11.
- KOTSYURBENKO, O. R., NOZHEVNIKOVA, A. N. & ZAVARZIN, G. A. (1993): Methanogenic degradation of organic matter by anaerobic bacteria at low temperature. - *Chemosphere* **27**: 1745-1761.
- KRUMBÖCK, M. & CONRAD, R. (1991): Metabolism of position-labelled glucose in anoxic methanogenic paddy soil and lake sediment. - *FEMS Microbiol. Ecol.* **85**: 247-256.
- KUIVILA, K.M., MURRAY, J.W. & DEVOL, A.H. (1989): Methane production, sulfate reduction and competition for substrates in the sediments of Lake Washington. - *Geochim. Cosmochim. Acta* **53**: 409-416.

-
- KUIVILA, K.M., MURRAY, J.W., DEVOL, A.H., LIDSTROM, M.E. & REIMERS, C.E. (1988): Methane cycling in the sediments of Lake Washington. - *Limnol. Oceanogr.* **33**: 571-581.
- KRZYCKI, J.A., KENEALY, W.R., DENIRO, M.J. & ZEIKUS, J.G. (1987): Stable carbon isotope fractionation by *Methanosarcina barkeri* during methanogenesis from acetate, methanol, or carbon dioxide-hydrogen. - *Appl. Environ. Microbiol.* **53**: 2597-2599.
- LANGE, N.A. (1979): *Handbook of Chemistry*, McGraw-Hill, New York.
- LANSDOWN, J.M., QUAY, P.D. & KING, S.L. (1992): CH₄ production via CO₂ reduction in a temperate bog : a source of ¹³C-depleted CH₄. - *Geochim. Cosmochim. Acta* **56**: 3493-3503.
- LERMAN, A. (1979): *Geochemical Processes. Water and Sediment Environments*, Wiley, New York.
- LOVLEY, D.R. & KLUG, M.J. (1982): Intermediary metabolism of organic matter in the sediments of a eutrophic lake. - *Appl. Environ. Microbiol.* **43**: 552-560.
- MOLONGOSKI, J.J. & KLUG, M.J. (1980): Anaerobic metabolism of particulate organic matter in the sediments of a hypereutrophic lake. - *Freshwater Biol.* **10**: 507-518.
- NAGUIB, M. (1982): Methanogenese im Sediment der Binnengewässer .1. Methanol als dominanter Methan-"Precursor" im Sediment eines eutrophen Sees. - *Arch. Hydrobiol.* **95**: 317-329.
- NAGUIB, M. (1988): Kinetics of acetate and methanol conversion into methane in eutrophic sediments and its application in anerobic systems. - *Water Sci. Tech.* **20**: 61-67.
- NAMSARAEV, B. B., DULOV, L. E., SOKOLOVA, E. N. & ZEMSKAYA, T. I. (1995): Bacterial methane production in the bottom sediments of Lake Baikal. - *Mikrobiologiya* **64**: 411-412.
- NOZHEVNIKOVA, A. N., HOLLIGER, C., AMMANN, A. & ZEHNDER, A. J. B. (1997): Methanogenesis in sediments from deep lakes at different temperatures (12-70°C). - *Water Sci. Tech.* **36**: 57-64.
- NOZHEVNIKOVA, A.N., KOTSYURBENKO, O.R. & SIMANKOVA, M.V. (1994): Acetogenesis at low temperature - In: Drake, H.L. (ed.): *Acetogenesis*, pp. 416-431, Chapman & Hall, New York.
- OVERBECK, J. & CHROST, R.J. (1994): *Microbial Ecology of Lake Plußsee*, Springer, New York.
- PETERS, V. & CONRAD, R. (1996): Sequential reduction processes and initiation of CH₄ production upon flooding of oxic upland soils. - *Soil Biol. Biochem.* **28**: 371-382.

-
- PETERS, V., JANSSEN, P. H. & CONRAD, R. (1999): Transient production of formate during chemolithotrophic growth of anaerobic microorganisms on hydrogen. - *Curr. Microbiol.* **38**: 285-289.
- PHELPS, T. J. & ZEIKUS, J. G. (1984): Influence of pH on terminal carbon metabolism in anoxic sediments from a mildly acidic lake. - *Appl. Environ. Microbiol.* **48**: 1088-1095.
- PHELPS, T.J. & ZEIKUS, J.G. (1985): Effect of fall turnover on terminal carbon metabolism in Lake Mendota sediments. - *Appl. Environ. Microbiol.* **50**: 1285-1291.
- QUAY, P.D., BROECKER, W.S., HESLEIN, R.H. & SCHINDLER, D.W. (1980): Vertical diffusion rates determined by tritium tracer experiments in the thermocline and hypolimnion of two lakes. - *Limnol. Oceanogr.* **25**: 201-218.
- RUDD, J.W.M. & HAMILTON, R.D. (1978): Methane cycling in a eutrophic shield lake and its effects on whole lake metabolism. - *Limnol. Oceanogr.* **23**: 337-348.
- RUDD, J.W.M. & TAYLOR, C.D. (1980): Methane cycling in aquatic environments. - *Adv. Aquat. Microbiol.* **2**: 77-150.
- SCHINK, B. & ZEIKUS, J.G. (1982): Microbial ecology of pectin decomposition in anoxic lake sediments. - *J. Gen. Microbiol.* **128**: 393-404.
- SCHULZ, S. & CONRAD, R. (1995): Effect of algal deposition on acetate and methane concentrations in the profundal sediment of a deep lake (Lake Constance). - *FEMS Microbiol. Ecol.* **16**: 251-259.
- SCHULZ, S. & CONRAD, R. (1996): Influence of temperature on pathways to methane production in the permanently cold profundal sediment of Lake Constance. - *FEMS Microbiol. Ecol.* **20**: 1-14.
- SCHULZ, S., MATSUYAMA, H. & CONRAD, R. (1997): Temperature dependence of methane production from different precursors in a profundal sediment (Lake Constance). - *FEMS Microbiol. Ecol.* **22**: 207-213.
- SCHÜTZ, H., SEILER, W. & CONRAD, R. (1989): Processes involved in formation and emission of methane in rice paddies. - *Biogeochem.* **7**: 33-53.
- SINKE, A. J. C., CORNELESE, A. A., CAPPENBERG, T. E. & ZEHNDER, A. J. B. (1992): Seasonal variation in sulfate reduction and methanogenesis in peaty sediments of eutrophic Lake Loosdrecht, The Netherlands. - *Biogeochem.* **16**: 43-61.
- STUMM, W. & MORGAN, J. J. (1981): *Aquatic Chemistry. An Introduction Emphasizing Chemical Equilibria in Natural Waters*, Wiley, New York.

SUGIMOTO, A., HONG, X & WADA, E. (1991): Rapid and simple measurement of carbon isotope ratio of bubble methane using GC/C/IRMS. - *Mass Spectros.* **39**: 261-266.

TAKII, S., LI, J.H. & HAYASHI, H. (1997): Methane production and sulfate reduction in profundal sediments in Lake Kizaki, Japan. - *Jpn. J. Limnol.* **58**: 373-384.

T

Table 1: Description of Lake Plußsee (adapted from Overbeck and Chrost 1994)

Location	54° 10'N, 10° 23'E
Height above sea level	24.5
Area (m ²)	142905
Volume (m ³)	1346810
Diameter (m)	approx. 400
Maximum depth (m)	29.4
Volume of epilimnion (0-5 m depth)	44%

Table 2: Overview of measurements and experiments conducted with sediment and water samples taken at different dates

Measurement and experiments	Nov 1997	June 1998	Aug 1998	Sep 1998	Oct 1998	Nov 1998	Jan 1999	Nov 1999
Rates of CH ₄ production in the sediment at 4 and 25°C	+	+	+	+	+	+	+	+
Concentration of CH ₄ in the water column			+	+	+		+	
Thermodynamics of methanogenesis and homoacetogenesis		+	+	+	+			+
Conversion of [2- ¹⁴ C]acetate to ¹⁴ CO ₂ and ¹⁴ CH ₄			+	+	+	+		+
Conversion of ¹⁴ C-bicarbonate to ¹⁴ CH ₄	+			+				
Conversion of ¹⁴ C-methanol to ¹⁴ CO ₂ and ¹⁴ CH ₄								+
Stimulation of CH ₄ production by addition of substrates			+	+	+			
Inhibition of CH ₄ production and accumulation of precursors					+			
stable isotopic composition ($\delta^{13}\text{CH}_4$, $\delta^{13}\text{CO}_2$)						+		

Table 3 : Homoacetogenic and methanogenic reactions, their standard enthalpies (ΔH°), standard Gibbs free energies (ΔG°), standard Gibbs free energies at 4°C (ΔG°_T), and in-situ Gibbs free energies at 4°C (ΔG_4) and 25°C (ΔG_{25}) in sediment slurries of Lake Plußsee; mean \pm SD.

Reaction	ΔH° (kJ)	ΔG° (kJ)	ΔG°_T (kJ)	ΔG_4 (kJ)	ΔG_{25} (kJ)
(1) $4 \text{ H}_2 + 2 \text{ CO}_2 \Rightarrow \text{CH}_3\text{COO}^- + \text{H}^+ + 2 \text{ H}_2\text{O}$	-270.6	-55.1	-70.3	29.5 ± 8.1	60.0 ± 12.5
(2) $4 \text{ H}_2 + \text{ CO}_2 \Rightarrow \text{CH}_4 + 2 \text{ H}_2\text{O}$	-252.9	-130.7	-137.7	-24.5 ± 7.2	-12.9 ± 5.0
(3) $\text{CH}_3\text{COO}^- + \text{H}^+ \Rightarrow \text{CH}_4 + \text{CO}_2$	-303.5	-73.0	-75.7	-36.1 ± 3.4	-35.3 ± 7.3
(4) $4 \text{ CH}_3\text{OH} \Rightarrow 3 \text{ CH}_4 + \text{CO}_2 + 2 \text{ H}_2\text{O}$	-206.3	-319.4	-304.4	$>-282.3 \pm 3.1$	$>-283.6 \pm 5.4$

ΔG -values of homoacetogenesis (reaction 1) and acetate-dependent methanogenesis (reaction 3) were from concentrations measured during experiments conducted with sediment sampled in October 1998. The data were averaged at 4°C from 115 h to 648 h and at 25°C from 40 h to 472 h incubation time.

ΔG -values of H_2/CO_2 -dependent methanogenesis (reaction 2) were calculated from the average of four different incubations with sediment from four different sampling time points in June, August, September and October 1998. The average was calculated from 20 h until the end of incubation when H_2 concentrations had reached steady state.

ΔG -values of methanol-dependent methanogenesis (reaction 4) were calculated from one incubation with sediment sampled in November 1999 during which the data measured between 40 and 410 h incubation time were averaged. A methanol concentration of 50 μM (= detection limit) was used for the calculations

Table 4: Methane budget in the hypolimnion: flux (F) of CH₄ from the sediment, gradient of dissolved CH₄ ($\partial c/\partial z$), total CH₄ (M_{CH₄}) accumulated, and apparent diffusion coefficient (D_e)

Sampling date	F (pmol cm ⁻² s ⁻¹)	($\partial c/\partial z$) (nM/cm)	M _{CH₄} (μmol/cm ²)	D _e (cm ² /s)
18 Aug 1998	8.27	73.8	184	0.112
23 Sep 1998	0.89	85.8	323	0.010
27 Oct 1998	1.61	118.0	319	0.014
26 Jan 1999	1.94	66.4	63	0.029

Table 5: Stable isotopic composition of CH₄ and CO₂ measured in the water adjacent to the sediment and in the sediment sampled in November 1998. The sediment data were obtained by analysis of the gas headspace at the end of a slurry incubation experiment; mean ± SE. The gases in the water are assumed to originate from the sediment.

Sample	d ¹³ CH ₄ (‰)	d ¹³ CO ₂ (‰)	a _c
Water at 28 m depth	-64.05 ± 1.69	-18.81 ± 1.15	1.048
Sediment, 4°C	-50.63 ± 2.57	-1.54 ± 0.85	1.052
Sediment, 25°C	-59.32 ± 1.12	-3.78 ± 0.03	1.057

Table 6: Turnover of [2-¹⁴C]acetate and [¹⁴C]methanol and methanogenesis in slurries of Lake Plußsee sediment

Parameter / substrate	[2- ¹⁴ C]acetate ¹		[¹⁴ C]methanol ²	
	25°C	4°C	25°C	4°C
Maximum fraction of [¹⁴ C]substrate converted to ¹⁴ CH ₄ and ¹⁴ CO ₂	0.34 ± 0.16	0.28 ± 0.13	0.25 ± 0.06	0.08 ± 0.0
T _t , turnover time (h)	23.9 ± 15.7	96.9 ± 15.0	95.8 ± 3.3	153 ± 12
C, substrate concentration (nmol/cm ³)	5.65 ± 4.58	5.65 ± 4.58	<50	<50
v, turnover rate (nmol h ⁻¹ cm ⁻³)	0.24 ± 0.36	0.01 ± 0.00	<0.13 ± 0.0	<0.03 ± 0.02
RI	0.14 ± 0.08	0.20 ± 0.09	0.46 ± 0.10	0.67 ± 0.04
P, CH ₄ production from substrate turnover (nmol h ⁻¹ cm ⁻³)	0.14 ± 0.18	0.01 ± 0.00	<0.07 ± 0.0	<0.01 ± 0.01
CH ₄ production rate (nmol h ⁻¹ cm ⁻³)	1.64 ± 0.36	0.22 ± 0.07	1.60 ± 0.08	0.18 ± 0.02

¹ Average of data from 4 different sampling time points (August 1998, September 1998, October 1998 and November 1999), each assayed in triplicate

² Average of data from 1 sampling time points (November 1999), assayed in triplicate

³ Calculated from equation (4)

Table 7: Production rates of CH₄ after addition of substrates; sediment was sampled in Sep to Oct 1998; mean ± SE of triplicates

CH ₄ production rate	25°C	4°C
in the following experiments	(nmol h ⁻¹ cm ⁻³ sediment)	
Control	1.83 ± 0.10	0.22 ± 0.03
1 mM Acetate	4.20 ± 0.23	0.16 ± 0.03
0.75 mM Methanol	2.52 ± 0.18	0.15 ± 0.04
1 mM Formate	1.83 ± 0.13	1.03 ± 0.84
4 % H ₂	6.65 ± 0.36	1.66 ± 0.09

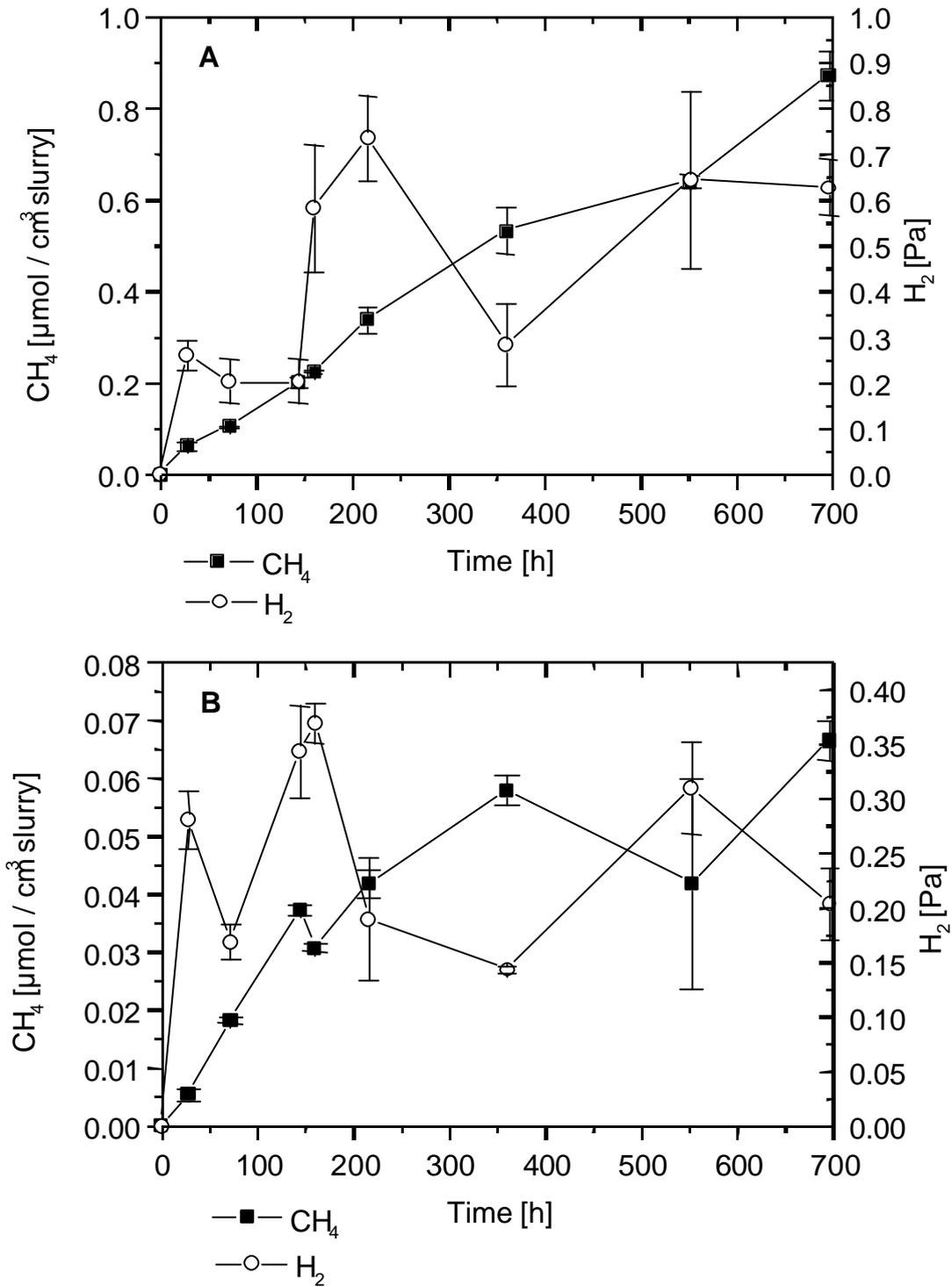


Figure 1: Methane production (μmol produced per cm^3 slurry) and hydrogen partial pressures (Pa) in sediment slurries at (A) 25°C and (B) 4°C; the samples were obtained in September 1998. Data are means of triplicates \pm standard error.

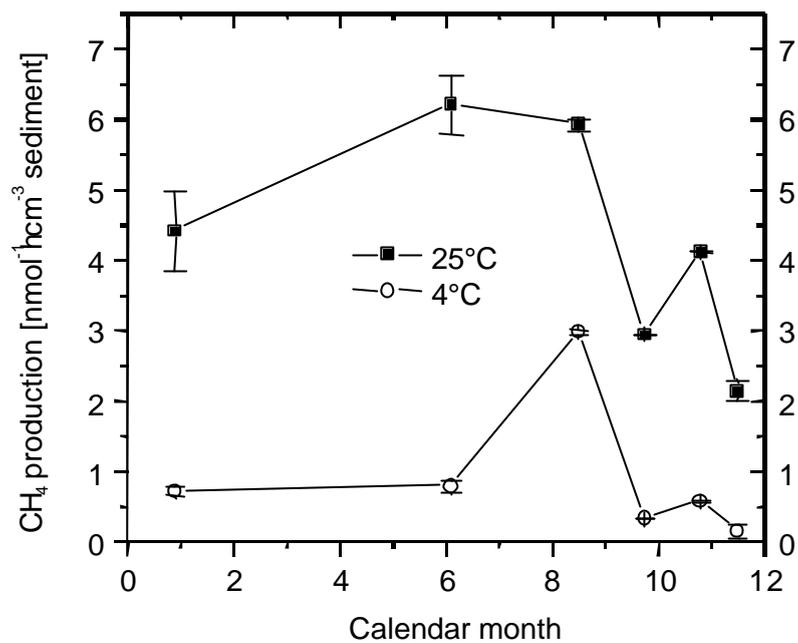


Figure 2: Methane production rates (μmol produced per cm^3 sediment) measured in sediment from Lake Plußsee sampled at several times during the year. Data are means of triplicates \pm standard error.

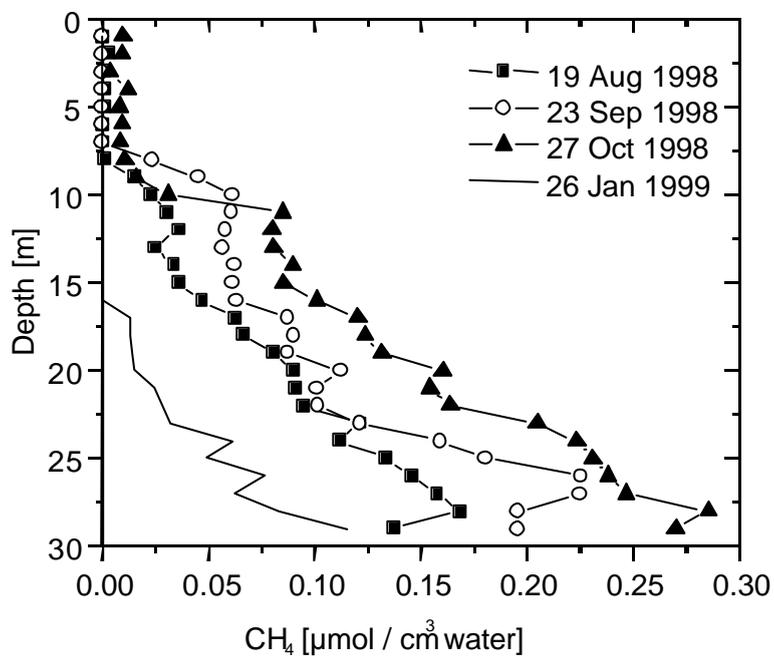


Figure 3: CH₄ concentrations in the water column of Lake Plußsee at different time. CH₄ measurements were done without replicates.

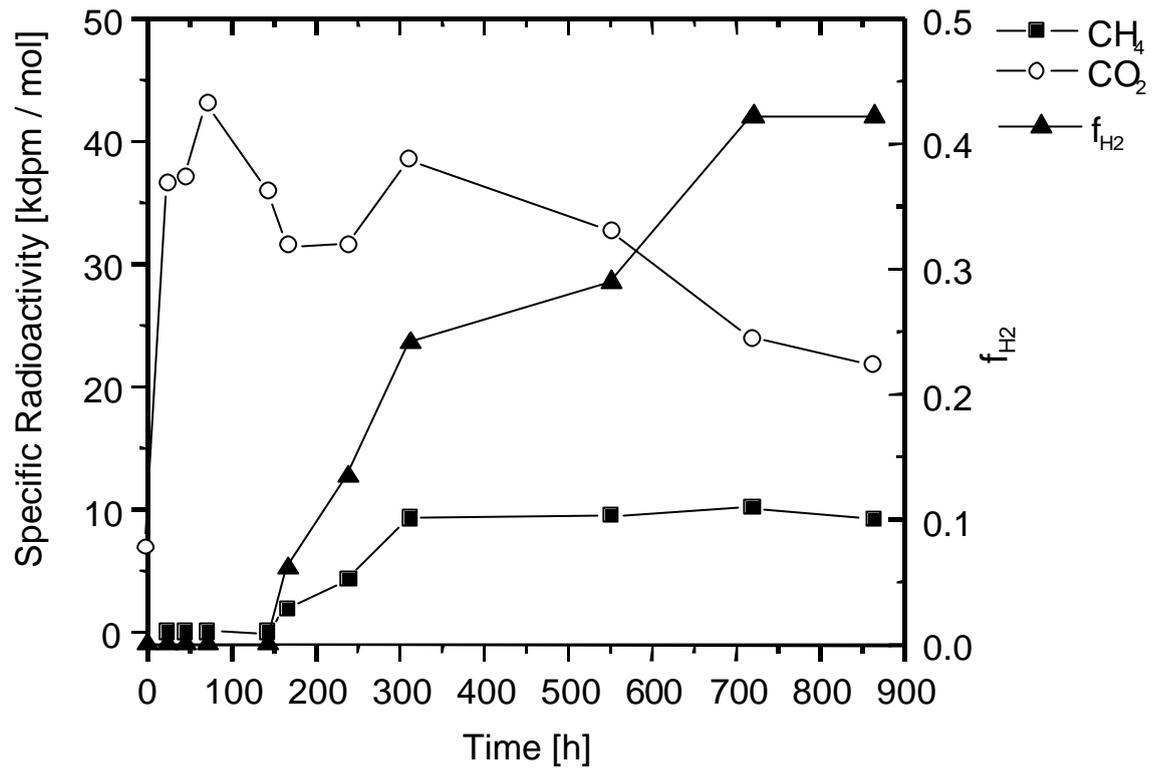


Figure 5: Turnover of $H^{14}CO_3^-$ to $^{14}CH_4$ and $^{14}CO_2$ at 25°C in profundal sediment slurries from Lake Plußsee sampled in September 1998. The specific radioactivity was calculated from the ratio of CH_4 to $^{14}CH_4$ and CO_2 to $^{14}CO_2$.

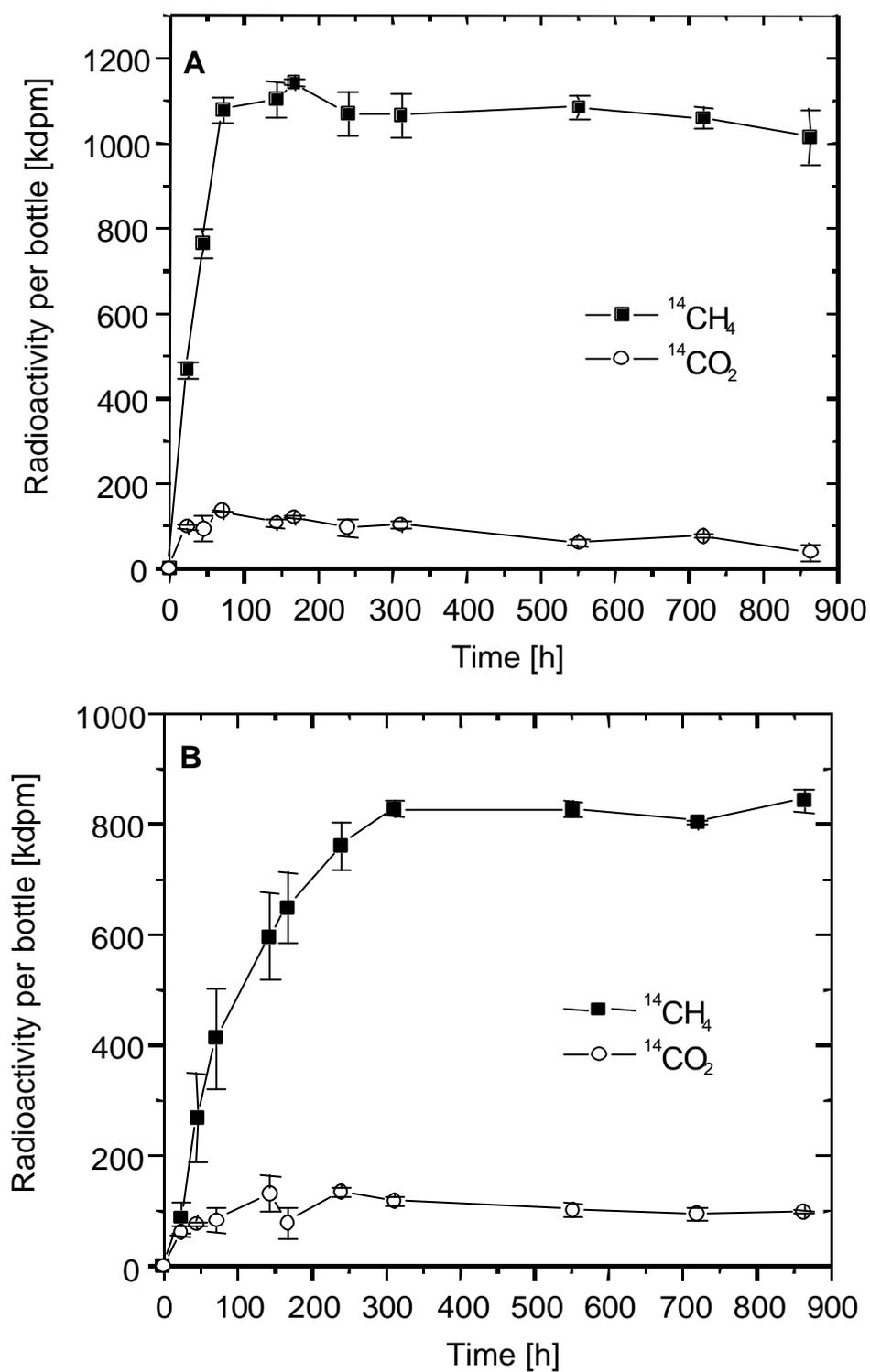


Figure 6: Turnover of $[2^{14}\text{C}]$ -acetate to $^{14}\text{CH}_4$ and $^{14}\text{CO}_2$ at (A) 25°C and (B) 4°C in profundal sediment slurries from Lake Plußsee sampled in September 1998. Data are means of triplicates \pm standard error.

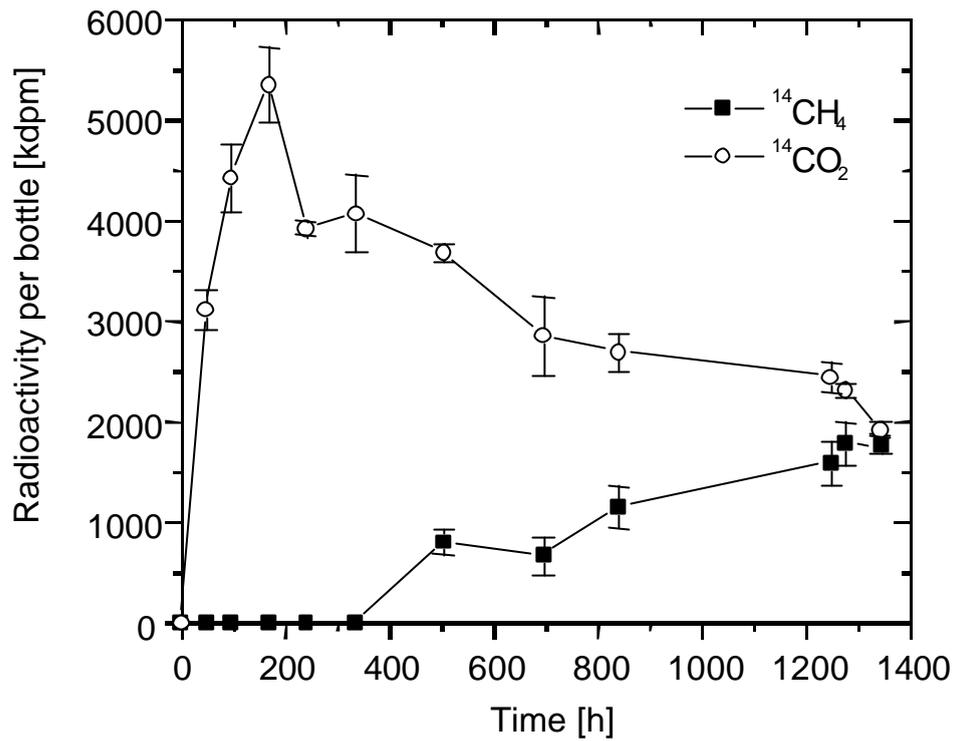


Figure 7: Turnover of $[1-^{14}\text{C}]$ acetate to $^{14}\text{CH}_4$ and $^{14}\text{CO}_2$ at 25°C in profundal sediment slurries of Lake Plußsee sampled in November 1997. Data are means of triplicates \pm standard error.

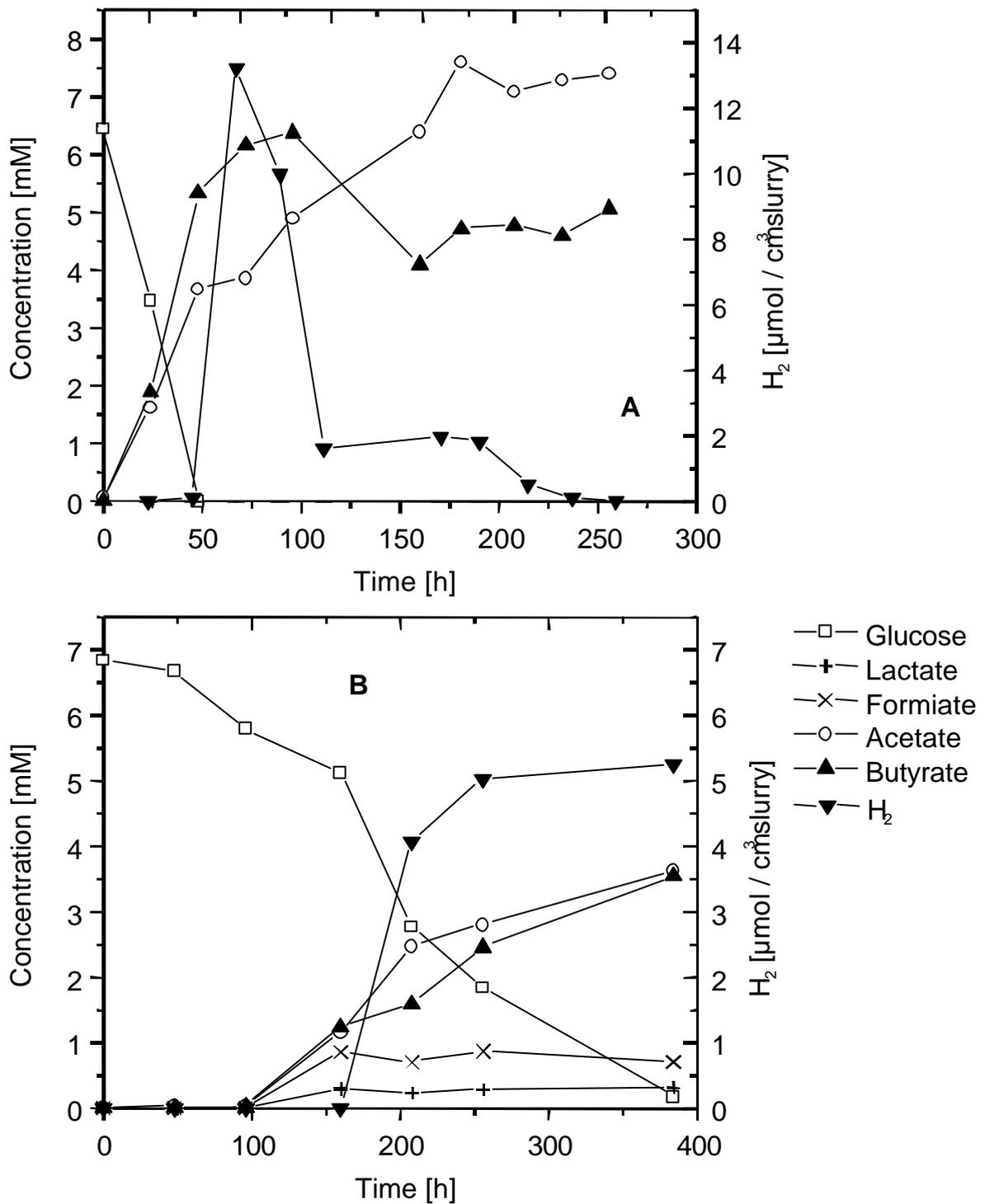


Figure 8: Accumulation of fatty acids after addition of glucose at (A) 25°C and (B) 4°C in profundal sediment slurries from of Lake Plußsee sampled in August 1998. Hydrogen concentrations give total H₂ in the bottle per cm³ slurry.

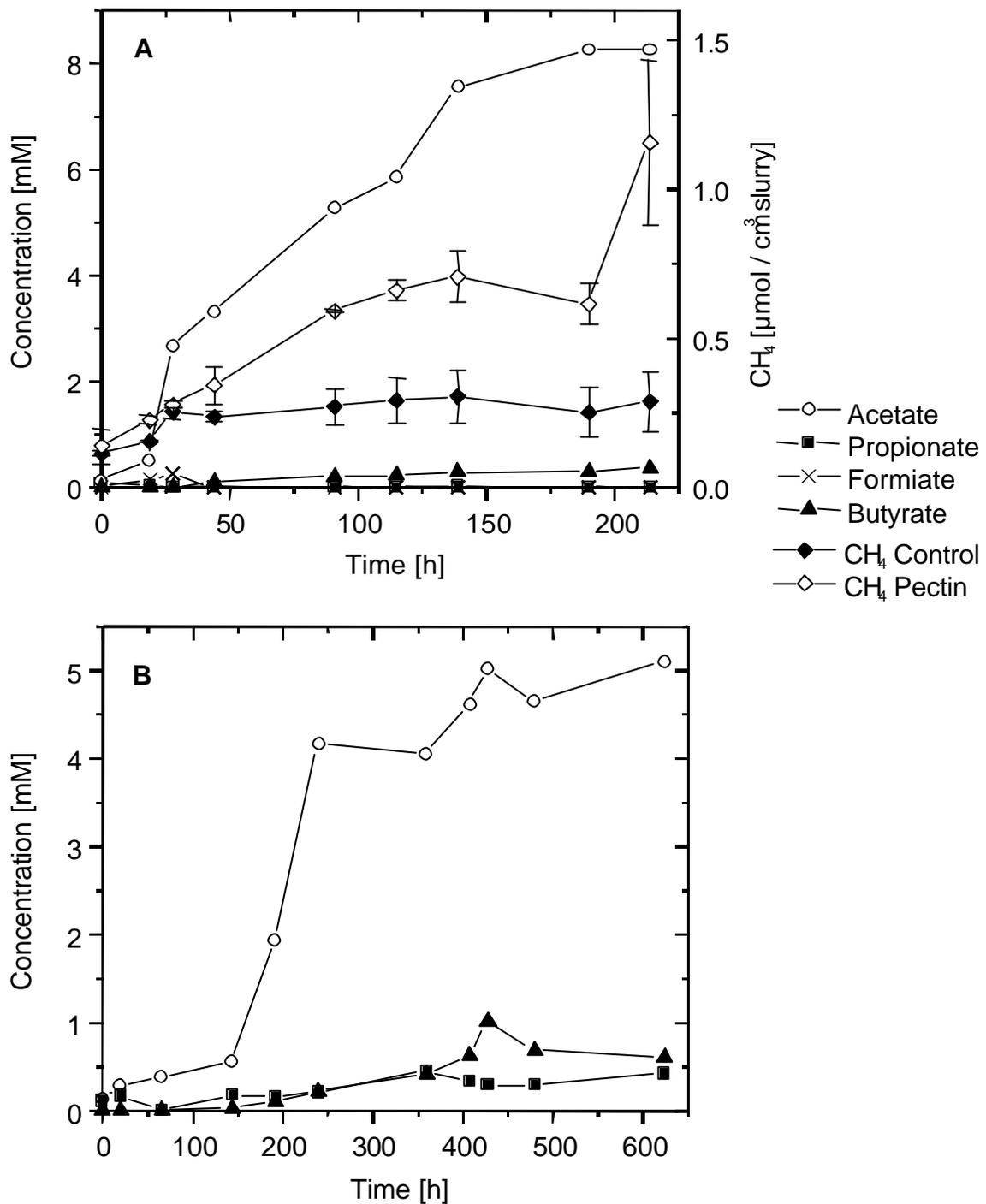


Figure 9: Accumulation of fatty acids after addition of pectin at (A) 25°C and (B) 4°C in sediment slurries from profundal sediment of Lake Plußsee sampled in August 1998. Methane concentrations give total CH₄ in the bottle per cm³ slurry.

Danksagung

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

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

Herrn PD. Dr. P. Frenzel danke ich für die logistischen und praktischen Ratschläge, ohne die die Probennahme in Plön und am See Genezareth sicher nicht so reibungslos verlaufen wären.

Herrn Dr. W. Eckert danke ich für die Bereitstellung eines Laborplatzes im Yigal Allon Kinneret Limnological Laboratory in Tiberias und für die Hilfestellung bei der Probenentnahme und -aufbereitung.

Herrn Dr. K.-P. Witzel und Herrn G. Augustin danke ich für die Hilfestellung bei der Probenentnahme in Plön.

Besonders bedanke ich mich auch bei Herrn Horst Henseling für die Planung und den Bau der für die Dienstreisen benötigten Gerätschaften.

Dr. H. Scholten, Dr. P. Dunefield, Dr. P. Bodelier und Dr. K.-J. Chin danke ich für die sehr hilfreichen Diskussionen während meiner Doktorarbeit.

Frau Melanie Klose und Herrn Peter Claus danke ich für die stete Hilfsbereitschaft bei der Durchführung der Messungen.

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

Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation "Einfluss der Temperatur auf die Methanbildung in anoxischen Standorten" selbstständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

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

Marburg / 31.05.00