

Methanogene Zersetzung von Stroh im Reisfeldboden

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

dem
Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Kristin Glißmann
aus Aachen

Marburg / Lahn 2000

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden vom 01.11.1997 bis zum 31.10.2000 am Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie in Marburg / Lahn unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Ralf Conrad durchgeführt.

Vom Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg als Dissertation
angenommen am: 24.10.2000

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

Tag der mündlichen Prüfung: 21.11.2000

Ein Großteil der während der Dissertation erzielten Ergebnisse ist in der folgenden Publikation veröffentlicht worden:

Glissmann, K. and R. Conrad (2000) Fermentation pattern of methanogenic degradation of rice straw in anoxic paddy soil. *FEMS Microbiology Ecology* 31: 117-126

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	I
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	IV
ZUSAMMENFASSUNG	1
1 EINLEITUNG	3
1.1 Methan als Treibhausgas	3
1.2 Reisfelder als Methanquelle	3
1.3 Der anaerobe Abbau von organischem Material im Reisfeldboden	4
1.4 Reisstroh als Kohlenstoffquelle für die Methanbildung	6
1.5 Ziel der vorliegenden Arbeit	9
2 MATERIAL UND METHODEN	10
2.1 Materialien	10
2.1.1 Reisfeldboden	10
2.1.2 Reisstroh	10
2.1.3 Eingesetzte Chemikalien und Gase	10
2.2 Ansätze	11
2.3 Inkubation der Ansätze	11
2.4 Probenahme	12
2.4.1 Gasproben	12
2.4.2 Porenwasser und Puffer	12
2.5 Hemmung der Methanogenese	12
2.6 Umsatz von ¹⁴ C-Bicarbonat	13
2.7 Bestimmung der cellulolytischen und hemicellulolytischen Aktivität	14
2.7.1 Enzymtests mit MUF-Substraten	14
2.7.2 Hemmung der Kohlenhydrataufnahme mit Toluol	16
2.8 Trennung von Boden und Stroh	17
2.8.1 Trennung und anschließende Inkubation der getrennten Ansätze	17
2.8.2 Trennung und anschließende Hemmung mit Toluol	18
2.8.3 Trennung und anschließende Enzymtests mit MUF-Substraten	18

2.9 Analytische Methoden	19
2.9.1 Gaschromatographische Analyse von CH ₄ und CO ₂	19
2.9.2 Gaschromatographische Analyse von H ₂	20
2.9.3 Bestimmung von organischen Säuren und Alkoholen	21
2.9.3.1 HPLC Analyse	21
2.9.3.2 Analyse von Fettsäuren im Gaschromatographen	21
2.9.4 Bestimmung radioaktiver Isotope	22
2.9.4.1 Szintillationsmessungen	22
2.9.4.2 Analyse von ¹⁴ C-Gasen	23
2.9.5 Bestimmung reduzierender Zucker	23
2.9.6 pH-Wert	24
2.9.7 Trockengewichtsbestimmung	24
2.10 Berechnungen	24
2.10.1 Konzentrationsangaben von Gasen	24
2.10.2 Produktionsraten	25
2.10.3 Massenbilanzierung	25
2.10.4 Thermodynamische Berechnungen	26
3 ERGEBNISSE	28
3.1 Methodenentwicklung	28
3.1.1 Inkubation von Reisstroh in Gazesäckchen	28
3.1.2 Hemmung der Zuckeraufnahme in die Zellen durch Toluol	29
3.1.3 Aktivitätstests für hydrolytische Enzyme mit MUF-Substraten	30
3.1.4 Puffer für die Inkubation von Stroh nach der Trennung vom Boden	33
3.2 Fermentation und Methanogenese	34
3.2.1 Einfluss von Reisstroh auf die Bildung von Fermentationsprodukten und CH ₄	35
3.2.2 Bildung von CH ₄ aus H ₂ /CO ₂	40
3.2.3 Hemmung der Methanogenese mit BES	40
3.2.3.1 Einfluss der Hemmung mit BES auf die Bildung von CH ₄ und Intermediaten	41
3.2.3.2 Massenbilanzierung	45
3.2.3.3 Thermodynamische Berechnungen	46
3.2.4 Weitere Substanzen, die während des Abbaus gefunden wurden	48

3.3 Hydrolyse der Polysaccharide	49
3.3.1 Zersetzung des Reisstrohs	49
3.3.2 Potentielle Aktivität hydrolytischer Enzyme	50
3.3.3 Freisetzung von Zuckern	51
3.4 Trennung der Kompartimente Stroh und Boden	53
3.4.1 Produktion von CH ₄ , H ₂ und Intermediaten des anaeroben Abbaus	54
3.4.1.1 <i>Konzentration von CH₄, H₂ und Intermediaten</i>	54
3.4.1.2 <i>Vergleich verschiedener Methanquellen</i>	59
3.4.1.3 <i>pH-Wert</i>	62
3.4.1.4 <i>Thermodynamische Berechnungen</i>	62
3.4.2 Hydrolyse der Polysaccharide	64
3.4.2.1 <i>Potentielle Aktivität hydrolytischer Enzyme</i>	64
3.4.2.2 <i>Freisetzung reduzierender Zucker</i>	67
4 DISKUSSION	69
4.1 Fermentation und Methanogenese	69
4.2 Hydrolyse der Polysaccharide	74
4.3 Limitierende Schritte bei der Methanbildung	80
4.4 Lokalisierung der Abbauprozesse	84
5 LITERATURVERZEICHNIS	92
ANHANG	104
Glissmann, K. and R. Conrad (2000). Fermentation pattern of methano- genic degradation of rice straw in anoxic paddy soil. FEMS Microbiology and Ecology 31: 117-126	104
Lebenslauf	114
DANKSAGUNG	115

Abkürzungsverzeichnis

BES	2-Bromethansulfonsäure
FU	relative Fluoreszenzeinheiten
GC	Gaschromatograph
GLN	Gluconolacton
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie, "High pressure liquid chromatography"
MUF	Methylumbelliferon
n	Anzahl der Proben
ppm _v	Millionstel bezogen auf das Volumen, "parts per million"
TG	Trockengewicht
UpM	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett

Zusammenfassung

Reisstroh ist eine der Hauptkohlenstoffquellen für die Bildung des Treibhausgases Methan in den anoxischen Böden von Reisfeldern. In dieser Arbeit wurden die Prozesse, die am anaeroben Abbau von Reisstroh beteiligt sind, in Aufschlammungen von Reisfeldboden unter anoxischen Bedingungen verfolgt und lokalisiert. Die Gärungsprozesse begannen unmittelbar nach Beginn der Inkubation und führten während der Reduktionsphase zu einer vorübergehenden Anhäufung der Intermediate Acetat, Propionat, Butyrat, Isobutyrat, Valerat, Isovalerat und Caproat. Die Konzentrationen waren nach der Zugabe von Stroh deutlich höher. Mit dem Sinken der Konzentrationen der Intermediate begann die Methanproduktion, die in Ansätzen mit Stroh viel höher war als in denjenigen ohne Stroh. Bei der Inkubation verschiedener Fraktionen des Reisstrohs in Boden, d. h. Stiel, Blattscheide und Blattspreite, zeigte sich, dass sich die verschiedenen Intermediate in unterschiedlichen Konzentrationen anhäuferten und verschiedene Mengen CH_4 gebildet wurden, im Verhältnis Stiel > Blattspreite > Blattscheide > Boden ohne Stroh. Während der methanogenen Phase wurde der Anteil der Gärungsprodukte an der Methanbildung durch die Hemmung der Methanogenese mit 2-Bromethansulfonsäure (BES) bestimmt. Acetat und Propionat waren die Hauptintermediate des vollständigen Abbaus von Reisstroh zu Methan, ungeachtet dessen, ob und welche Fraktion des Strohs zugesetzt wurde. Ebenso unabhängig davon waren die relativen Anteile von H_2/CO_2 und Acetat an der Methanbildung, die über den Umsatz von radioaktiv markiertem $^{14}\text{CO}_2$ zu CH_4 gemessen wurden und 11 bis 27 % bzw. 73 bis 89 % betragen. In der methanogenen Phase konnte kein Unterschied im Abbaumuster zwischen den verschiedenen Strohfraktionen und Reisfeldboden ohne Stroh festgestellt werden. Die potentiellen Aktivitäten der hydrolytischen Enzyme Xylosidase, Glucosidase und Exoglucanase stiegen innerhalb von 11 Tagen an und blieben dann konstant. Die aktuelle Aktivität sank dagegen im gleichen Zeitraum ab, bis sie konstante Werte erreichte. Grund für die geringe aktuelle Aktivität war vermutlich eine verminderte Zugänglichkeit der Polysaccharide für die hydrolytischen Enzyme. Der Vergleich der Konzentrationen von reduzierenden Zuckern, H_2 , Acetat und CH_4 in den Ansätzen zeigte, dass es während des anaeroben Abbaus des Reisstrohs vier verschiedene Phasen gab, in denen unterschiedliche Abbauschritte für die Methanbildung limitierend waren. In Phase I (< 1 Tag) war die Fermentation der durch die Hydrolyse freigesetzten Zuckermonomere limitierend, in Phase II (bis Tag 7) die Methanogenese selbst und in Phase IV (ab Tag 17) die Hydrolyse der Polysaccharide. In Phase III (Tage 7 bis 17) war die Methanbildung nicht limitiert. Die Trennung der Kompartimente Stroh und Boden nach gemeinsamer

Inkubation zeigte unabhängig von der Zeit bis zur Trennung, dass das Stroh der Hauptort der Hydrolyse der Biopolymere und der fermentativen Prozesse war, während im Boden hauptsächlich die syntrophen und methanogenen Prozesse stattfanden. Die Fermentationsprodukte wurden am Stroh freigesetzt und standen danach im Boden zur Verfügung. Ein vollständiger Abbau zu CH_4 konnte nur durch die Kombination der Prozesse in beiden Kompartimenten erreicht werden.

1 Einleitung

1.1 Methan als Treibhausgas

Methan (CH_4) und Kohlendioxid (CO_2) sind die beiden Kohlenstoffverbindungen, die am häufigsten in der Erdatmosphäre vorkommen. Die Konzentration von atmosphärischen CH_4 ist im Laufe der letzten Jahre um 0,8 bis 1,1 % pro Jahr gestiegen und liegt bei 1,7 bis 1,8 ppm_v (Cicerone und Oremland 1988, Burke und Lashof 1990, Neue *et al.* 1990, Schütz *et al.* 1990, Conrad 1993, Mosier 1998). Trotz der relativ geringen Konzentration ist CH_4 mit einem geschätzten Beitrag zur Erderwärmung von 18 bis 25 % ein bedeutendes Treibhausgas (Burke und Lashof 1990, Schütz *et al.* 1990, Mosier *et al.* 1998). Zum einen trägt es direkt durch die Absorption von erdreflektierter Infrarotstrahlung zum Treibhauseffekt bei, wobei die Absorption von CH_4 ungefähr 30 mal höher ist als die von CO_2 (Neue *et al.* 1990, Neue 1993, Mosier *et al.* 1998). Zum anderen nimmt CH_4 auch durch photochemische Abbauprozesse Einfluss auf andere klimarelevante Gase wie Ozon, Hydroxylradikale und Wasserdampf (Cicerone und Oremland 1988, Schütz *et al.* 1990, Prinn 1994). Die geschätzte globale Gesamtemission von CH_4 liegt im Moment bei 410 bis 660 Tg pro Jahr (IPCC 1994).

CH_4 wird zu ungefähr 30 % aus natürlichen Quellen wie Feuchtgebieten, z. B. Sümpfen, dem Verdauungstrakt von Termiten oder Seen freigesetzt, 70 % stammen aus anthropogen beeinflussten Quellen (IPCC 1994). Die wichtigsten Methanquellen sind dabei die Nutzung fossiler Brennstoffe, z. B. in der Petroleum-Industrie (15 bis 28 %), die Viehwirtschaft (beziehungsweise der Verdauungstrakt der Wiederkäuer) (15 bis 22 %) und Reisfelder (16 bis 20 %) (Cicerone und Oremland 1988, IPCC 1994).

1.2 Reisfelder als Methanquelle

Reis kann in zwei verschiedenen Formen angebaut werden, im sogenannten Nassanbau oder im Trockenanbau. Beim Nassanbau stehen die Reisfelder während der Anbauzeit oder zumindest den größten Teil dieser Zeit unter Wasser, d. h. die Böden sind wassergesättigt. Die Wasserversorgung der Felder kann durch kontrolliertes Fluten, Regenwasser oder durch den direkten Anbau von Reis in natürlichen Gewässern gesichert werden (Neue 1993). Nach dem Fluten der Felder wird die Sauerstoffdiffusion in den wassergesättigten Böden schnell limitiert, so dass anoxische Bedingungen entstehen. Nach der Reduktion der sogenannten alternativen Elektronen-

akzeptoren, Nitrat, Mangan (IV), Eisen (III) und Sulfat, und der damit verbundenen Senkung des Redoxpotentials ist CH_4 das Endprodukt des anaeroben Abbaus von organischem Material (Conrad 1993, Achtnich *et al.* 1995, Chidthaisong und Conrad 1999, Yao *et al.* 1999, Lueders und Friedrich 2000).

Im Trockenanbau werden die Felder dagegen nicht geflutet, so dass der Boden zu keiner Zeit wassergesättigt ist und daher oxisch bleibt. Da der anaerobe Abbau an anoxische Verhältnisse gebunden ist, wird hier kein CH_4 gebildet. Aus dem Trockenanbau stammen jedoch nur 13 % des globalen Reisertrages (Neue 1993).

Reisfelder spielen aber nicht nur für die Methankonzentration in der Atmosphäre eine große Rolle, sondern auch für die Ernährung der Weltbevölkerung. Reis ist in vielen Ländern das wichtigste Grundnahrungsmittel. Mit zunehmender Bevölkerung ist daher auch ein verstärkter Reisanbau zu erwarten. Von 1950 bis 1984 wurde die Reiserzeugung bereits verdreifacht (Burke und Lashof 1990). Mit einem weiteren Anstieg von 518 auf ungefähr 760 Millionen Tonnen wird für den Zeitraum von 1990 bis 2020 gerechnet (Neue 1993). Besonders der Anbau in den ertragreichen gefluteten Reisfeldern wird verstärkt werden, was zu höheren CH_4 -Emissionen führen wird.

Aufgrund der Bedeutung der Reisfelder für den Methanhaushalt in der Atmosphäre und für die Ernährung der Weltbevölkerung sind die Prozesse, die an der CH_4 -Bildung beteiligt sind, und die Faktoren, die sie beeinflussen, von großem Interesse. Gerade der Einfluss verschiedener Faktoren, wie Temperatur oder Bodenart, auf die CH_4 -Emission waren bereits Gegenstand mehrerer Untersuchungen (Chin und Conrad 1995, Neue *et al.* 1996, Chidthaisong *et al.* 1999a, Rath *et al.* 1999, Yao *et al.* 1999). Als einer der Faktoren mit dem stärksten Einfluss auf die CH_4 -Emission wird das Einbringen von organischem Material gesehen (Cicerone *et al.* 1992, Delwiche und Cicerone 1993, Huang *et al.* 1998, Yao *et al.* 1999).

1.3 Der anaerobe Abbau von organischem Material im Reisfeldboden

Der anaerobe Abbau von organischem Material (Abbildung 1-1) ist im Prinzip bekannt (Zehnder 1978, Schink 1992, Conrad 1993, Stams 1994). Im ersten Schritt werden die Biopolymere, z. B. Polysaccharide, hydrolytisch in Oligo- und Monomere gespalten, die anschließend zu Fettsäuren, Alkoholen, CO_2 und H_2 umgesetzt werden. Die Fettsäuren und Alkohole werden syntroph weiter zu Acetat, CO_2 und H_2 abgebaut. Acetat kann zudem aus H_2/CO_2 , Zuckern und anderen Substraten homoacetogen gebildet

werden. Der letzte Abbauschritt ist die Methanogenese, d. h. der Umsatz von H_2/CO_2 oder Acetat zu den Endprodukten CH_4 und CO_2 . Neben Acetat und H_2/CO_2 können auch Alkohole, CO oder Formiat als direkte Vorläufer für die Methanogenese dienen (Garcia 1990). Acetat und H_2/CO_2 sind jedoch die wichtigsten Substrate der methanogenen *Archaea* (Takai 1970, Stams 1994, Chin und Conrad 1995, Conrad 1999). An den jeweiligen Abbauschritten sind auch verschiedene Gruppen von Mikroorganismen beteiligt: Bakterien mit extrazellulären hydrolytischen Enzymen, Gärer, syntrophe Mikroorganismen, Homoacetogene und methanogene *Archaea*.

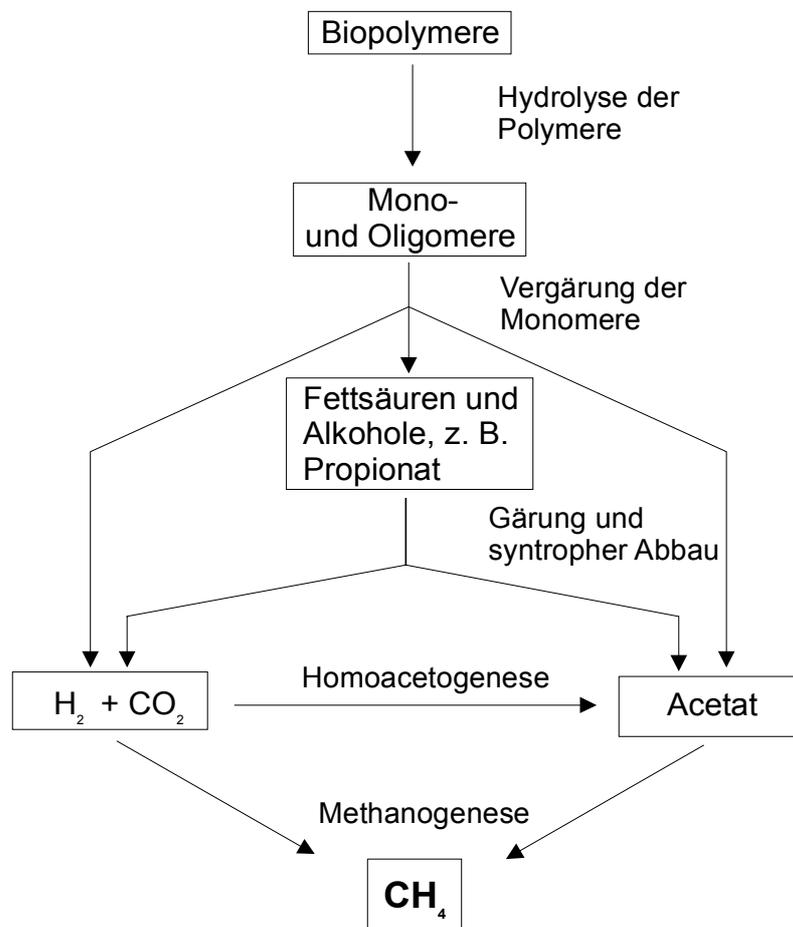


Abbildung 1-1: Prozesse des anaeroben Abbaus von organischem Material zu Methan unter anoxischen Bedingungen

Die Prozesse, die am Abbau von organischem Bodenmaterial in anoxischem Reisfeldboden beteiligt sind, waren bereits Gegenstand mehrere Untersuchungen (Achnich *et al.* 1995, Chin und Conrad 1995, Krylova *et al.* 1997, Klüber und Conrad 1998, Conrad 1999). Dabei zeigte sich z. B., dass Acetat, Propionat und Caproat wichtige Intermediate des Abbaus waren und dass Acetat und H_2/CO_2 die wichtigsten Methanvorläufer waren. Daneben gibt es Berichte über den anaeroben Abbau von einzelnen

Kohlenhydraten wie Glucose, Cellulose, Hemicellulose, Xylan und Pectin im Reisfeldboden (Yamane und Sato 1964, Saito *et al.* 1990, Krumböck und Conrad 1991, Joulain *et al.* 1996, Chin *et al.* 1998, Chidthaisong *et al.* 1999b, Chidthaisong und Conrad 1999). Diese Untersuchungen haben gezeigt, dass es Unterschiede bezüglich der Intermediate und der Geschwindigkeit des Abbaus zu CH₄ zwischen verschiedenen Kohlenhydraten gibt. So setzte z. B. bei der Zugabe von Xylan die CH₄-Produktion zu einem späteren Zeitpunkt ein als bei der Zugabe von Cellulose, und es kam zu einer kurzfristigen Anhäufung von H₂ und Ethanol. Beim Abbau von Cellulose war das hingegen nicht der Fall (Joulain *et al.* 1996). Cellulose dagegen führte zu einer verstärkten Produktion von Lactat, die beim Einsatz von Xylan nur gering war (Chin *et al.* 1998).

Bei diesen Versuchen mit einzelnen Biopolymeren blieb unberücksichtigt, dass das Pflanzenmaterial, das in Reisfelder eingebracht wird, normalerweise ein komplexes Substrat aus verschiedenen Bestandteilen ist. Cellulosefibrillen sind z. B. von Hemicellulose umgeben, so dass die Hemicellulose erst zum Teil abgebaut werden muss, bevor die Cellulose für die hydrolytischen Enzyme zugänglich wird (Leshine 1995). Silikate auf der Oberfläche von organischem Material können die Kolonisierung durch Mikroorganismen erschweren (Bae *et al.* 1997). Versuche mit Cellulose und Stroh zeigten, dass beim Abbau von Cellulose mehr Methan freigesetzt wurde als beim Abbau von Stroh (Chidthaisong *et al.* 1996, Oyediran *et al.* 1996). Das organische Material, z. B. Reisstroh, muss daher im ganzen als Substrat für den anaeroben Abbau eingesetzt werden, um alle Faktoren in die Untersuchungen einzubeziehen.

1.4 Reisstroh als Kohlenstoffquelle für die Methanbildung

Reisstroh besteht aus verschiedenen Biopolymeren, hauptsächlich Cellulose (32 bis 37 %), Hemicellulose (29 bis 37 %), Lignin (5 bis 15 %) und wasserlöslichen Polysacchariden (8 %). Zusätzlich enthält es anorganische Komponenten (15 bis 25 %) wie z. B. Silikate (Tsutsuki und Ponnampereuma 1987, Watanabe *et al.* 1993, Saito *et al.* 1994, Shen *et al.* 1998, Grant 1998). Besonders die Polysaccharide können der komplexen mikrobiellen Gemeinschaft, die organisches Material zu CH₄ und CO₂ abbaut, als Substrate dienen. Die Biopolymere setzen sich hauptsächlich aus Glucose, dem Cellulosebaustein, und Xylose, dem Hauptbestandteil des Xylans in Reisstroh (49 %), zusammen (Muryama 1984). Der anaerobe Abbau von Lignin selbst war lange umstritten (Zeikus 1980, Benner *et al.* 1984, Colberg 1988), der Abbau einzelner Bestandteile dieses in seiner Zusammensetzung sehr unterschiedlichen

Biopolymers wurde jedoch unter anderem in anoxischen Sedimenten nachgewiesen (Benner *et al.* 1984, Berry *et al.* 1987).

Die Sprosse von Reispflanzen sind aus verschiedenen morphologischen Teilen aufgebaut, dem Stiel, der Blattscheide, die den Stiel und zum Teil das darüber liegende Blatt einschließt, und der freistehenden Blattspreite (Abbildung 1-2). Die drei Strohfraktionen unterscheiden sich nicht nur morphologisch, sondern auch in ihrer Zusammensetzung. So enthält der Stiel z. B. weniger Hemicellulose und Silikate, aber mehr Cellulose als die anderen Strohfraktionen (Shen *et al.* 1998).

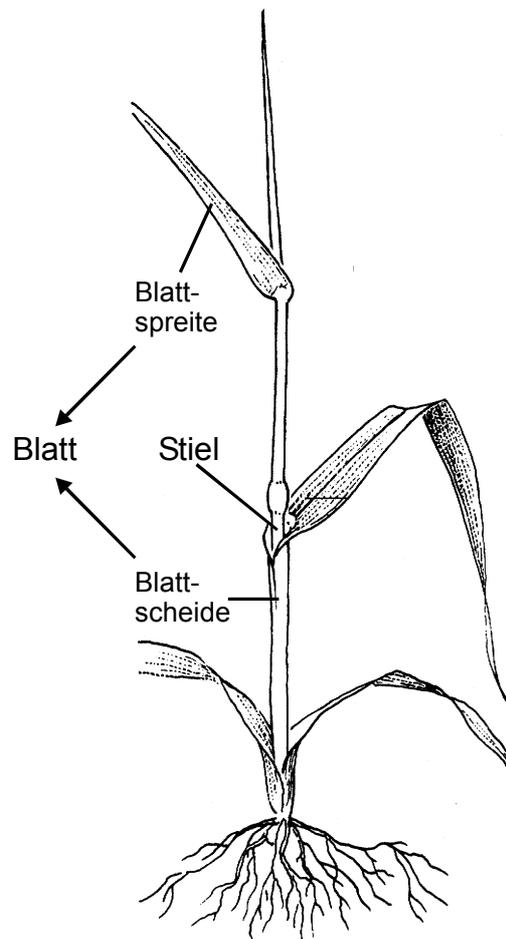


Abbildung 1-2: Morphologische Unterteilung von Süßgräsern (*Poaceae*), z. B. Reis, in Stiel, Blattscheide und Blattspreite (nach Christiansen und Hancke 1993, verändert)

Eine im Reisanbau verbreitete Methode des Düngens ist es, das Reisstroh vom Vorjahr vor dem Bepflanzen und Fluten der Reisfelder unterzupflügen. Dadurch wird Reisstroh zu einer der Hauptkohlenstoffquellen für die Methanproduktion im anoxischen Reisfeldboden, wie Versuche mit Reisstroh und Reispflanzen gezeigt haben (Holzapfel-Pschorn *et al.* 1986, Kimura *et al.* 1991, Minoda *et al.* 1996, Chidthaisong

und Watanabe 1997, Watanabe *et al.* 1998, Dannenberg und Conrad 1999). 42 % des Kohlenstoffes für die CH₄-Produktion stammen aus Reisstroh, 18 bis 21 % aus organischen Verbindungen, die von Reispflanzen freigesetzt werden (Wurzelexudate), und 37 bis 40 % aus organischem Bodenmaterial (Watanabe *et al.* 1999).

Es konnte gezeigt werden, dass der Eintrag von Reisstroh in die Reisfelder, die CH₄-Emission stark erhöhte (Schütz *et al.* 1989a, Yagi und Minami 1990, Sass *et al.* 1991, Delwiche und Cicerone 1993, Denier van der Gon und Neue 1995, Chidthaisong *et al.* 1996, Watanabe und Kimura 1998, Rath *et al.* 1999). In diesen Versuchen wurde jedoch zumeist nur die Bildung der Endprodukte des anaeroben Abbaus untersucht (Oyediran *et al.* 1996, Chidthaisong und Watanabe 1997, Rath *et al.* 1999). Die Zwischenschritte des Abbauprozesses wurden bislang nicht im Detail und in Verbindung miteinander untersucht. Acharya (1935) verfolgte zwar die Bildung von Intermediaten während des Abbaus von Reisstroh, die zeitlichen Abstände zwischen den Messungen waren jedoch sehr groß. Dadurch blieb z. B. die verstärkte Produktion von Intermediaten und Endprodukten in den ersten Wochen der Inkubation, die beim Abbau von Polysacchariden beobachtet wurden (Chin und Conrad 1995, Joulain *et al.* 1996), unberücksichtigt. Auch die Veränderung des Strohs im Laufe der Inkubation in Reisfeldboden wurde schon anhand der Zuckerzusammensetzung, mikroskopischer Aufnahmen oder der Abnahme der Trockenmasse verfolgt (Murayama 1984, Saito *et al.* 1994, Bae *et al.* 1997, Kimura und Tun 1999). Die Aktivität der hydrolytischen Enzyme und die daraus resultierende Freisetzung der Monomere wurden dabei nicht näher beschrieben, obwohl die Hydrolyse als limitierender Schritt des Abbaus gilt (Billen *et al.* 1982, Benner *et al.* 1984, King 1986). Bisher nicht beachtet wurde auch, ob die Abbauprozesse auf verschiedene Kompartimente aufgeteilt sind, auf den Boden und auf die Strohstücke, die kleine, vom Boden abgegrenzte Kompartimente darstellen. Die am Abbau beteiligten Mikroorganismen, die das Stroh besiedeln, wurden schon mit mikroskopischen Methoden beobachtet (Saito *et al.* 1990, Bae *et al.* 1997, Kimura und Tun 1999). An welchen Abbauschritten die gefundenen Mikroorganismen beteiligt sind und wie aktiv sie sind, blieb dabei jedoch unberücksichtigt.

1.5 Ziel der vorliegenden Arbeit

Reisstroh wird als eine der Hauptkohlenstoffquellen für die Bildung von Methan in Reisfeldern angesehen. In der hier vorliegenden Arbeit sollte der anaerobe Abbau des Strohs zu Methan in anoxischen Aufschlammungen von Reisfeldböden verfolgt werden.

Ein wichtiger Aspekt war dabei die Untersuchung der am Abbau beteiligten Prozesse von der Hydrolyse der Biopolymere über die freigesetzten Intermediate bis zur Bildung der Endprodukte CH_4 und CO_2 . Außerdem sollte untersucht werden, ob es eine Aufteilung der Abbauprozesse auf die Kompartimente Reisstroh und Reisfeldboden gibt, indem das Stroh nach einer bestimmten Inkubationszeit wieder aus den Bodenaufschlammungen entfernt wurde und beide Kompartimente anschließend getrennt untersucht wurden.

Die Hydrolyse der Polysaccharide sollte zum einen als potentielle Aktivität von drei hydrolytischen Enzymen bestimmt werden. Zum anderen sollte die aktuelle Aktivität als Freisetzung von reduzierenden Zuckern gemessen werden. Die Bildung von Fettsäuren, CH_4 und CO_2 von Stroh in Reisfeldböden sollte zunächst im Laufe der Inkubation verfolgt werden. Anschließend sollte der Anteil der Intermediate an der Bildung von CH_4 und der Anteil des CH_4 , der aus H_2/CO_2 gebildet wurde, bestimmt werden. Das Stroh wurde wegen eines möglichen Einflusses der unterschiedlichen Zusammensetzung in die folgenden morphologischen Fraktionen unterteilt: Stiel, Blattscheide und Blattspreite.

Die vorliegende Arbeit stand in engem Zusammenhang mit einer weiteren Arbeit zum anaeroben Abbau des Reisstrohs, in der die mikrobiellen Populationen, die das Reisstroh während des Abbaus besiedelten, untersucht wurden (Dissertation von Sabine Weber).

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Reisfeldboden

Der Boden stammte ursprünglich von den Reisfeldern des Istituto Sperimentale della Cerealicoltura (ISC) in Vercelli, Italien. Er wurde bereits für den Anbau von Reis in Mikrokosmen im Gewächshaus des Institutes verwendet. Die Charakteristika dieses Bodens wurden von Holzapfel-Pschorn *et al.* (1986) beschrieben. Pflanzenreste wurden vor der weiteren Verarbeitung des Bodens entfernt. Der Boden wurde an der Luft getrocknet, mit einem Backenbrecher (Typ BB1, Fa. Retsch, Haan) zerkleinert und mit einem rostfreien Stahlsieb auf eine Größe unter 2 mm gesiebt. Anschließend wurde er bei Raumtemperatur in Polyethylenwannen gelagert.

2.1.2 Reisstroh

Das Stroh stammte von Reispflanzen (*Oryza Sativa*, Typ *japonica*), die im Gewächshaus des Institutes in Mikrokosmen (Varietät "Roma") oder auf den Reisfeldern in Vercelli (Varietät "Koral") wuchsen. Nach der Ernte der Pflanzen wurde das Stroh getrocknet und bei Raumtemperatur gelagert.

Das Stroh wurde in die morphologischen Teile Stiel, Blattspreite und Blattscheide (Abbildung 1-2) unterteilt. Die verschiedenen Strohsorten wurden in getrennten Ansätzen eingesetzt. Wenn nicht anders angegeben, wurden die Experimente mit Stroh vom Stiel der Reispflanzen durchgeführt.

2.1.3 Eingesetzte Chemikalien und Gase

Alle Chemikalien besaßen den Reinheitsgrad "zur Analyse". Für die Enzymtests mit Methylumbelliferon-Substraten (siehe Kapitel 2.7.1) wurden die Substrate und anderen Chemikalien von Sigma (Deisenhofen) bezogen, ebenso das p-Hydroxybenzoesäurehydrazid für die Bestimmung der reduzierenden Zucker. Die anderen Chemikalien stammten von den Firmen Fluka (München) oder Merck (Darmstadt), das verwendete radioaktiv markierte ¹⁴C-Bicarbonat von Amersham (Braunschweig). Technische Gase wurden von Messer-Griesheim (Frankfurt) bezogen.

2.2 Ansätze

Alle Versuche wurden nach folgendem Schema angesetzt: Glasflaschen mit einem Volumen von 150 ml (Müller und Krempel, Bülach, Schweiz) wurden mit 40 g trockenem Boden und 40 ml autoklaviertem und entgastem destilliertem Wasser befüllt. Nach der Zugabe von 0,5 g Reisstroh (in 2 bis 3 cm grosse Stücke geschnitten) wurden die Flaschen mit Naturgummistopfen und Schraubkappen verschlossen und von Hand kräftig geschüttelt. Die Gasphase wurde mehrmals gegen N₂ ausgetauscht. Alle Versuche wurden in drei Parallelen angesetzt.

Für die Versuche, in denen Stroh und Boden nach einer gemeinsamen Inkubation wieder getrennt wurden (siehe Kapitel 2.8), wurde das Stroh in Gazesäckchen (7x7 cm) zugesetzt. Die Gazesäckchen bestanden aus Nylon (Nytal P25, Maschenweite 25 µm, Fadenstärke 30 µm, Fa. Bückmann, Mönchengladbach) und wurde mit einem Polyamidfaden (Transfil 70, Amann Ackermann) genäht.

Für die Bestimmung der hydrolytischen Aktivität mit Hilfe von MUF-Substraten (Methylumbelliferyl-Substrate, siehe Kapitel 2.7.1) wurden kleinere Ansätze hergestellt, in denen das Verhältnis von Boden, Wasser und Stroh im Vergleich zu den oben genannten Ansätzen jedoch beibehalten wurde. Hier wurden 1,5 g Boden, 1,5 ml Wasser und 0,02 g Stroh in 15-ml-Inkubationsröhrchen mit Butylgummistopfen eingesetzt.

Ansätze, denen Toluol zugesetzt wurde (siehe Kapitel 2.7.2 und 2.8.2), enthielten in 150-ml-Flaschen 20 g Boden, 20 ml Wasser und 0,25 g Stroh, um beim Schütteln auf dem Horizontalschüttler nach Zugabe des Toluols eine gleichmäßige Durchmischung erzielen zu können.

Zusätzlich wurden Ansätze vorbereitet, in denen nur Stroh, ohne vorherige Inkubation mit Boden, in 150-ml-Flaschen mit 50 ml sterilem 6 mM Kaliumphosphatpuffer und 30 mM NaHCO₃ inkubiert wurde (vergleiche Kapitel 2.8.1).

2.3 Inkubation der Ansätze

Die Inkubation aller Ansätze erfolgte bei 25°C im Dunkeln. Die Ansätze wurden, außer bei der Vorbereitung und vor der Entnahme von Proben, nicht geschüttelt. Bei einer Inkubation über mehrere Monate wurde über eine Kanüle Druck aus den Flaschen abgelassen, wodurch die Zusammensetzung der Gasphase jedoch nicht verändert wurde.

2.4 Probenahme

2.4.1 Gasproben

Vor der Entnahme von Gasproben wurden die Ansätze sorgfältig von Hand geschüttelt, um ein Gleichgewicht der Gase in der Flüssig- und der Gasphase herzustellen. Die Entnahme der Gasproben (0,2 ml) aus den Ansätzen mit Bodensuspension erfolgte unsteril mit einer gasdichten "pressure lock"-Spritze (VICI, Baton Rouge LA, USA) unmittelbar vor der Analyse der Gase im Gaschromatographen (GC). Aus Ansätzen, in denen Stroh in sterilem Puffer inkubiert wurde (siehe Kapitel 2.8), wurden die Proben steril nach Abflammen mit 70 %-igem Ethanol mit Einwegspritzen und -kanülen entnommen. Mit einer dafür geeigneten Kanüle (Fa. Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz, Schweiz) wurden sie im Anschluss direkt aus den Einwegspritzen in den GC injiziert.

2.4.2 Porenwasser und Puffer

Ansätze mit Bodensuspension wurden vor der Entnahme von Porenwasserproben geschüttelt und anschließend stehen gelassen, bis sich die Bodenpartikel abgesetzt hatten. Vom Überstand wurde 1 ml Probe mit sterilen Spritzen mit langen Kanülen entnommen. Die Entnahme von Proben (1 ml) aus Ansätzen, in denen Stroh in Puffer inkubiert wurde (siehe Kapitel 2.2 und 2.8), erfolgte nach sorgfältigem Schütteln unter sterilen Bedingungen.

Die Porenwasser- und Pufferproben wurden in Eppendorf-Reaktionsgefäßen zentrifugiert (15 min, 13000 UpM, 4 °C), der Überstand abdekantiert und bis zur Analyse bei -27 °C in Eppendorf-Reaktionsgefäßen gelagert.

2.5 Hemmung der Methanogenese

Nach einer Hemmung der Methanogenese sammeln sich H₂ und Gärungsprodukte an. Durch eine anschließende Massenbilanzierung kann auf ihre Beteiligung an der Methanproduktion zurückgeschlossen werden. Die Methanogenese wurde hier selektiv mit 2-Bromethansulfonsäure (BES) gehemmt. BES ist ein Analogon zum Coenzym M und dadurch ein kompetitiver Inhibitor des Methyl-Reduktase-Komplexes (Oremland and Capone 1988).

Nach Erreichen einer konstanten Methanbildungsrate (28 Tage nach Beginn der Inkubation) wurde die Gasphase der Ansätze erneut gegen N₂ ausgetauscht und 1 ml einer entgasten 1 M BES-Lösung zugesetzt, so dass eine Endkonzentration von 20 mM erreicht wurde. Anschließend wurden die Ansätze sorgfältig geschüttelt. Zusätzlich wurden Kontrollen angesetzt, denen entgastes destilliertes Wasser statt der BES-Lösung zugesetzt wurden. Gas- und Porenwasserproben wurden unmittelbar nach der Zugabe des Hemmstoffes und zu verschiedenen weiteren Zeitpunkten wie unter Kapitel 2.4 beschrieben entnommen.

2.6 Umsatz von ¹⁴C-Bicarbonat

Der relative Anteil von H₂/CO₂ an der Gesamtproduktion von Methan wurde durch den Umsatz von radioaktiv markiertem ¹⁴CO₂ zu ¹⁴CH₄ bestimmt.

Nach Erreichen einer konstanten Methanbildungsrate (28 Tage nach Beginn der Inkubation), wurde die Gasphase erneut gegen N₂ ausgetauscht und 1 ml NaH¹⁴CO₃ pro Gefäß zugesetzt, so dass in den Ansätzen eine Radioaktivität von 1,5 µCi (5·10⁴ Bq) eingestellt wurde. Gasproben wurden nach sorgfältigem Schütteln direkt nach der Zugabe und zu verschiedenen weiteren Zeitpunkten entnommen und auf die Konzentrationen und Radioaktivität von CH₄ und CO₂ hin untersucht.

Aus den Konzentrationen der radioaktiv markierten bzw. nicht markierten Gase ergeben sich die spezifischen Radioaktivitäten (SR) von CH₄ und CO₂:

$$SR_{CH_4} = \text{dpm } CH_4 / \text{mol } CH_4$$

$$SR_{CO_2} = \text{dpm } CO_2 / \text{mol } CO_2$$

Aus ihnen läßt sich der f-Faktor berechnen, der ein Maß für den Anteil von CH₄ aus H₂/CO₂ ist (Conrad und Schütz 1988).

$$f_{H_2} = SR_{CH_4} / SR_{CO_2}$$

2.7 Bestimmung der cellulolytischen und hemicellulolytischen Aktivität

Bei der Hydrolyse der Polymere wurden zwei verschiedene Aktivitäten unterschieden, die potentielle und die aktuelle Aktivität (siehe Kapitel 1-2). Die potentielle Aktivität wurde durch den Zusatz von künstlichen Substraten mit der fluoreszierenden Komponente Methylumbelliferon (MUF) bestimmt (Boschker und Cappenberg 1994). Die aktuelle Aktivität wurde als Anhäufung reduzierender Zucker im Porenwasser nach der Hemmung der Zuckeraufnahme in die Zellen durch Toluol gemessen (Boschker *et al.* 1995).

2.7.1 Enzymtests mit MUF-Substraten

Die potentiellen Aktivitäten der β -Glucosidase, der Exo- β -1,4-Glucanase und der Xylosidase wurden mit Hilfe künstlicher Methylumbelliferon-Substrate bestimmt. Die eingesetzten Substrate sind eine Verbindung aus einem Zuckeranteil und dem Fluoreszenzfarbstoff Methylumbelliferon (MUF). Durch die Enzymaktivität wird das MUF freigesetzt, dessen Konzentration fluorimetrisch bestimmt werden kann. Die Freisetzung des MUF dient als direktes Maß für die Enzymaktivität (Boschker und Cappenberg 1994). In Tabelle 2-1 werden die MUF-Substrate und die natürlichen Substrate und Reaktionsprodukte der untersuchten Enzyme gegenübergestellt.

Tabelle 2-1: Gegenüberstellung der eingesetzten Methylumbelliferon-Substrate und der natürlichen Substrate und Reaktionsprodukte der untersuchten hydrolytische Enzyme.

MUF ¹ - Substrat	Enzym	natürliches Substrat	natürliches Reaktionsprodukt
MUF-Glucosid	β -Glucosidase	Cellobiose	Glucose
MUF-Xylosid	Xylosidase	Xylobiose	Xylose
MUF-Cellobiosid			
ohne Gluconolacton	Exo- β -1,4-glucanase	Cellulose	Cellobiose
	β -Glucosidase	Cellobiose	Glucose
mit Gluconolacton	Exo- β -1,4-glucanase	Cellulose	Cellobiose

¹ MUF=Methylumbelliferon

Die von Boschker und Cappenberg (1994) für Sedimente entwickelte Methode wurde leicht verändert. Als Probematerial für die Enzymtests dienten die Ansätze mit Boden

und Stroh (Probenvolumen 2 ml, siehe Kapitel 2.2) und die Ansätze mit den getrennten Stroh- bzw. Bodenproben (Probenvolumen 0,3 ml, siehe Kapitel 2.8.3).

Zu den Ansätzen wurden 0,5 ml 50 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 7) gegeben. Bei Verwendung von MUF-Cellobiosid als Substrat wurde zu einem Satz Proben zusätzlich 0,3 ml Gluconolactonlösung zugesetzt, um die Aktivität der Glucosidase zu hemmen. Der Test wurde durch die Zugabe von 1 ml des jeweiligen Substrates gestartet. Die verwendeten Konzentrationen der Substrate sind in Tabelle 2-2 aufgeführt. Die Proben wurden anschließend bei 25 °C im Dunkeln stehend für die in Tabelle 2-2 aufgeführte Zeit inkubiert. Um die Reaktion zu stoppen wurden aus den Ansätzen mit Boden und Stroh 1,8 ml entnommen und zu 5 ml 96 %-igem Ethanol gegeben. Die Ansätze mit Boden oder Stroh wurden aufgrund des geringeren Volumens vollständig mit 5 ml Ethanol gemischt. Nach der Zentrifugation (5000 UpM, 20 min, 4 °C) wurden 4 ml des Überstandes zu 1 ml Glycinpuffer gegeben. Die Fluoreszenz des freigesetzten MUF wurde im Spektrofluorometer (Modell RF-540 mit Data Recorder DR-3, Fa. Shimadzu, Kyoto, Japan) mit einer Anregungswellenlänge von 365 nm und einer Emissionswellenlänge von 450 nm gemessen. Mit Hilfe einer Eichgeraden und unter Berücksichtigung der Blindwerte und des Volumens des Ansatzes (3,5 bzw. 3,8 ml beim Zusatz von Gluconolacton) konnten die Fluoreszenzeinheiten in nmol freigesetztes MUF pro Ansatz und Stunde umgerechnet werden.

Für die Erstellung einer Eichgerade wurden als Substrat MUF-Lösungen verschiedener Konzentrationen (0, 50, 100, 200 μ M) eingesetzt. Die entsprechenden Konzentrationen in den Ansätzen im Enzymtest betragen 0; 14,3; 28,6 bzw. 57,2 nmol/ml. Für die Messung der Blindwerte wurden 1,8 ml des Ansatzes unmittelbar nach Zusatz des Substrates zu 5 ml Ethanol gegeben. Die weitere Durchführung verlief wie oben beschrieben. Für die Ansätze mit Boden und Stroh, die Ansätze nur mit Boden und die Ansätze mit Stroh wurden jeweils getrennt Eichgeraden erstellt und Blindwerte gemessen.

Die Enzymaktivitäten in den Ansätze, in denen Stroh bzw. Boden getrennt eingesetzt wurden, sollten mit denjenigen in den Ansätzen mit Boden und Stroh, die als Kontrollen dienten, verglichen werden. Dazu wurden die Enzymaktivitäten auf das gleiche Trockengewicht (TG) des Bodens bzw. des Strohs bezogen. Als Bezugsgröße dienten dabei das TG des Bodens und das des Strohs in den Kontrollen, und die Aktivitäten in den getrennten Ansätzen wurden auf diese TG umgerechnet. Das TG des Bodens bzw. des Strohs in den getrennten Ansätzen wurden dazu bestimmt, indem der Rest des Überstandes nach der Zentrifugation verworfen wurde und die vor

Beginn des Enzymtests ausgewogenen Röhrchen mit dem verbliebenen Stroh bzw. Boden bei 105 °C über Nacht getrocknet wurden. Das TG des Bodens in den Kontrollen betrug jeweils 1,5 g (vergleiche Kapitel 2.2). Das Stroh wurde in einer Menge von 0,02 g eingesetzt. Sein TG nahm jedoch im Laufe der Inkubation ab, wie sich bei der Bestimmung des TG von Stroh (bei einem Ausgangsgewicht von 0,5 g) im Laufe der Zeit gezeigt hatte (Abbildung 3-15). Diese Abnahme musste berücksichtigt werden, wenn die Enzymaktivitäten in den Ansätzen mit Stroh und in den Kontrollen dem gleichen TG des Strohs entsprechen sollten. Das TG des Strohs in den Kontrollen, auf das die Aktivitäten bezogen wurden, betrug nach 7 Tagen 0,02 g (100 % des Ausgangsgewichtes), nach 30 Tagen 0,016 g (80,3 %) und nach 113 Tagen 0,0057 g (28,4 %).

Tabelle 2-2: Inkubationszeiten und Substratkonzentrationen in den Enzymtests mit MUF-Glucosid, MUF-Cellobiosid und MUF-Xylosid.

Substrat	Substratkonzentration [mM]	Inkubationszeit [min]
MUF-Glucosid	3	15
MUF-Cellobiosid	4	90
MUF-Xylosid	3	15

Gluconolactonpuffer: 500 mM Gluconolacton in 0,1 M Kaliumphosphatpuffer
pH 7,0

Glycinpuffer: Stammlösung I: 1 M Glycin mit 1 M NaCl
Stammlösung II: 1 M NaOH
Puffer: 512 ml Lösung I und 488 ml Lösung II
pH 11,0

2.7.2 Hemmung der Kohlenhydrataufnahme mit Toluol

Durch Toluol wird die Aufnahme von Kohlenhydraten durch Mikroorganismen gehemmt, ohne dass die extrazelluläre Hydrolyse von Polysacchariden beeinflusst wird. Die bei der Hydrolyse der Polymere freigesetzten Mono- und Oligosaccharide sammeln sich daher in den Ansätzen an, so dass die Zunahme der Konzentration von reduzierenden Zuckern im Porenwasser als Maß für die Hydrolyse genommen werden kann (Boschker *et al.* 1995).

Die Hemmung der Ansätze erfolgte zu unterschiedlichen Zeitpunkten im Laufe der Inkubation. Hierfür wurden 0,9 ml Toluol den Ansätzen mit einer Glasspritze

(Typ TP 4001, Fa. Unimetrics, Shorewood, Illinois, USA) zugesetzt, so dass eine Endkonzentration von 3 % in den Ansätzen vorlag. Anschließend wurden die Ansätze kräftig von Hand geschüttelt, um eine gute Durchmischung zu erreichen. Die weitere Inkubation der Ansätze erfolgte bei 25 °C auf einem Horizontalschüttler mit 120 UpM. Unmittelbar vor der Zugabe des Toluols und 4, 6, 24 und 26 Stunden nach der Zugabe wurde je 1 ml Probe aus dem Porenwasser wie in Kapitel 2.4.2 beschrieben entnommen und auf reduzierende Zucker untersucht (siehe Kapitel 2.9.5).

2.8 Trennung von Boden und Stroh

In dieser Versuchsreihe wurde das Stroh zu verschiedenen Zeitpunkten aus den Ansätzen entfernt (nach einer und nach vier Wochen sowie nach drei bis vier Monaten). Stroh und Boden wurden anschließend getrennt voneinander inkubiert, um die Prozesse, die in den beiden Kompartimenten des Systems ablaufen, getrennt voneinander untersuchen zu können. Zum einen wurde die Bildung von CH₄, CO₂, H₂ und organischen Säuren verfolgt, zum anderen die Freisetzung von reduzierenden Zuckern nach der Hemmung mit Toluol untersucht. In weiteren Ansätzen wurde die Aktivität der Polysaccharid spaltenden Enzyme am Stroh und im Boden bestimmt.

2.8.1 Trennung und anschließende Inkubation der getrennten Ansätze

Mit diesen Versuchen sollte die Bildung von CH₄, CO₂, H₂ und Gärungsprodukten in den verschiedenen Kompartimenten verfolgt werden. Nach 7, 28 und 97 Tagen wurde das Stroh unter einer N₂-Atmosphäre in der Anaerobenbank aus den Ansätzen (siehe Kapitel 2.2) entfernt. Die Gasesäckchen wurden zunächst im Ganzen in Kaliumphosphatpuffer (7,5 mM, pH 7) abgespült. Anschließend wurden die Strohstücke einzeln nochmals in Phosphatpuffer gewaschen. Das Stroh wurde dann in Glasflaschen (150 ml) mit 40 ml sterilem 7,5 mM Kaliumphosphatpuffer gegeben. Nach dem Austauschen der Gasphase gegen N₂/CO₂ (80:20), wurden 10 ml einer 150 mM NaHCO₃-Lösung zugesetzt.

Die Flaschen mit dem Boden wurden nach Entfernen des Strohs wieder verschlossen und die Gasphase erneut gegen N₂ ausgetauscht. In Kontrollansätzen wurden Boden und Stroh weiter zusammen inkubiert. Auch in diesen Ansätzen wurde die Gasphase erneut gegen N₂ ausgetauscht. In Tabelle 2-3 sind die oben beschriebenen Ansätze mit den im folgenden verwendeten Bezeichnungen aufgelistet.

Tabelle 2-3: Bezeichnung der Ansätze für die Experimente mit getrennter Inkubation von Boden und Stroh.

Bezeichnung	Ansatz
Kontrolle	Boden und Stroh
Bodenansatz	Boden nach der Trennung vom Stroh
Strohansatz	Stroh nach der Trennung vom Boden in Kaliumphosphatpuffer mit NaHCO ₃

Die weitere Inkubation der Proben erfolgte bei 25 °C stehend im Dunkeln. Gas- und Porenwasser- bzw. Pufferproben wurden zu verschiedenen Zeitpunkten wie unter Kapitel 2.4.2 beschrieben entnommen.

2.8.2 Trennung und anschließende Hemmung mit Toluol

Durch die Hemmung der Kohlenhydrataufnahme mit Toluol (siehe Kapitel 2.7.2) in den getrennten Ansätzen wurde die Freisetzung von Zuckern am Stroh und im Boden untersucht. Die Trennung wurde wie unter Kapitel 2.8.1 beschrieben nach 7, 27 und 126 Tagen durchgeführt. Den Ansätzen wurde direkt nach der Trennung Toluol zugesetzt. Durch die Zugabe von 0,9 ml zu den Bodenansätzen und 1,5 ml zu den Pufferansätzen wurde eine Konzentration von 3 % in den Ansätzen erreicht. Die weitere Inkubation und Probenahme erfolgte wie unter Kapitel 2.7.2 beschrieben. Als Kontrollen dienten die unter Kapitel 2.7.2 beschriebenen Ansätze.

2.8.3 Trennung und anschließende Enzymtests mit MUF-Substraten

Hier wurden Boden und Stroh nach der Trennung in Enzymtests mit Methylumbelliferon-Substraten (MUF-Substrate) eingesetzt, um die Aktivität hydrolytischer Enzyme in den Kompartimenten zu untersuchen.

Das Stroh wurde nach 7, 30 und 113 Tagen aus den Ansätzen entfernt und mit Puffer gewaschen (siehe Kapitel 2.8.1). Mit einer Schere wurde das Stroh in 3 bis 5 mm große Stücke geschnitten. 4 bis 6 dieser Stücke wurden pro Ansatz in 0,3 ml 50 mM Kaliumphosphatpuffer gegeben. Für die Bodenansätze wurden nach Entfernen des Strohs 0,3 ml der Bodensuspension pro Ansatz in die Inkubationsröhrchen pipettiert. Alle Inkubationsröhrchen wurden für die spätere Bestimmung des Trockengewichtes von Boden und Stroh zuvor ausgewogen. Die Durchführung des Enzymtests ist in Kapitel 2.7.1 beschrieben.

2.9 Analytische Methoden

2.9.1 Gaschromatographische Analyse von CH₄ und CO₂

Die Konzentrationen von CH₄ und CO₂ in der Gasphase wurden mit Hilfe eines Gaschromatographen GC-8A der Firma Shimadzu (Kyoto, Japan) mit einem Flammenionisationsdetektor bestimmt. Das Probenvolumen betrug 200 µl.

Säule: Edelstahlsäule
Länge: 2 m
Durchmesser: 1/8 Zoll
Trägermaterial: Porapack QS 50/100 mesh
Betriebstemperatur: 40 °C

Trägergas: Wasserstoff 5.0

Detektor: Flammenionisationsdetektor (FID)
Brenngase: FID-Mix (mit N₂ und O₂) und H₂
Quenchgas: Stickstoff 5.0
Betriebstemperatur: 110 °C

Nachweisgrenze: 1 ppm_v CH₄

Für die Bestimmung von CO₂ war an den GC hinter der Trennsäule ein Methanisator (Eigenbau) angeschlossen, in dem CO₂ und CO zu CH₄ reduziert wurden.

Säule: NiCr-Ni-Katalysator von Chrompack (Middelburg, Niederlande)
Trägermaterial: Chromosorb P 45/60 mesh
Länge: 20 cm
Innerer Durchmesser: 1/8 Zoll
Betriebstemperatur: 350 °C

Die Messwerte wurden aufgezeichnet mit einem Integrator C-R A6 der Firma Shimadzu. Für die Eichung wurde ein Standardgas mit ungefähr 1000 ppm_v CH₄, 1000 ppm_v CO₂ und 1000 ppm_v CO verwendet.

2.9.2 Gaschromatographische Analyse von H₂

Wasserstoffkonzentrationen unter bzw. über 100 ppm_v wurden mit verschiedenen Gaschromatographen bestimmt. Das Probenvolumen betrug jeweils 200 µl.

H₂-Konzentrationen < 100 ppm_v wurden mit einem Gaschromatographen mit Reduktivgasdetektor (RGD2, Trace Analytical, Techmaton Vertriebsgesellschaft für Umweltanalytik, Düsseldorf) bestimmt.

Säule: Edelstahlsäule
Länge: 1,4 m
Durchmesser: 1/2 Zoll
Trägermaterial: Molsieb 5 Å, 80-100 mesh
Betriebstemperatur: 60 °C

Trägergas: Synthetische Luft

Detektor: HgO-Konversions-Detektor
Betriebstemperatur: 280 °C

Nachweisgrenze: 1 ppm_v H₂

H₂-Konzentrationen ≥ 100 ppm_v wurden mit Hilfe eines Gaschromatographen (GC-8A) der Firma Shimadzu (Kyoto, Japan) mit Wärmeleitfähigkeitsdetektor (WLD) bestimmt.

Säule: Edelstahlsäule
Länge: 2 m
Durchmesser: 1/8 Zoll
Trägermaterial: Molsieb 5 Å, 80 - 100 mesh
Betriebstemperatur: 80 °C

Trägergas: Stickstoff 5.0

Detektor: Wärmeleitfähigkeitsdetektor (WLD)
Betriebstemperatur: 80 °C

Die Aufnahme der Messdaten erfolgte an beiden Gaschromatographen mit einem Integrator C-R A6 der Firma Shimadzu. Für die Kalibrierungen wurden Eichgase mit ungefähr 50 ppm_v (Messungen mit dem RGD2) bzw. ungefähr 1000 ppm_v (Messungen mit dem GC-8A) H₂ in Stickstoff eingesetzt.

2.9.3 Bestimmung von organischen Säuren und Alkoholen

Vor der Analyse in der HPLC (High pressure liquid chromatography) oder im Gaschromatographen wurden die eingefrorenen Porenwasser- oder Pufferproben (siehe Kapitel 2.4.2) durch einen 0,2 µm-Membranfilter (regenerierte Cellulose, Satorius, Göttingen) filtriert.

2.9.3.1 HPLC Analyse

Die Konzentrationen von organischen Säuren und Alkoholen wurden durch eine HPLC-Analyse bestimmt. Die Anlage bestand aus einer Pumpe SP1000 und einem Säulenofen S4110 der Firma Sykam (Gilching), einem RI-Detektor und einem UV-Detektor. Die Proben wurden durch den automatischen Probenaufgeber Jasco 851-AS (Fa. Jasco, Japan) injiziert. Für die computergestützte Aufnahme und Auswertung der Messdaten stand das Programm Peak Simple (SRI-Instruments, Torrence, USA) zur Verfügung.

Säule:	Edelstahlsäule Länge: 30 cm Durchmesser: 7,8 mm Trägermaterial: Aminex HPX 87 H Interaction, Vertrieb Schambeck SFD GmbH (Bad Honnef)
Fließmittel:	1 mM Schwefelsäure
Flussrate:	0,8 ml/min
Ofentemperatur:	65 °C
Detektoren:	RI-Detektor: Typ Erc-7512 (ERMA CR. Inc., Tokyo) (Brechungsindex), Betriebstemperatur: 40 °C UV-Detektor: Uvis 200 (LINEAR Instruments, Reno, USA), Wellenlänge: 205 nm

2.9.3.2 Analyse von Fettsäuren im Gaschromatographen

Die Konzentrationen von Caproat und Butyrat wurden mit Hilfe des Gaschromatographen (GC 8160, Fa. Carlo Erba Instrumentazione, Fisons, Hofheim) mit einem Flammenionisationsdetektor (FID) zusätzlich überprüft. Um die zu messenden Säuren zu protonieren, wurden die Proben mit einer 0,2 M Ameisensäurelösung 1:2 verdünnt, die zusätzlich 2 mM Octan als internen Standard enthielt. Eine Probe von 1 µl wurde injiziert.

Säule:	Länge: 30 m Durchmesser: 0,32 mm Trägermaterial: FFAP (J & W Scientific, Folson, USA) Betriebstemperatur: 140 °C
Trägergas:	Wasserstoff 5.0 Zuleitungsdruck: 65 kPa
Detektor:	Flammenionisationsdetektor (FID) Betriebstemperatur: 220 °C
Injektor:	Split: 1:10 Betriebstemperatur: 220 °C
Nachweisgrenze:	50 µM

Die Proben wurden aufgegeben mit dem Autosampler Combi Pal der Firma CTC Analytics (Vertrieb Chromtech, Idstein Taunus). Die Auswertung der Daten erfolgte über einen Integrator C-R A6 der Firma Shimadzu (Kyoto, Japan).

2.9.4 Bestimmung radioaktiver Isotope

2.9.4.1 Szintillationsmessungen

Mit Hilfe der Szintillationsmessungen kann die Radioaktivität in Flüssigkeiten gemessen werden. Diese Methode wurde benutzt für die Überprüfung der angesetzten Stammlösung des radioaktiv markierten Bicarbonates (siehe Kapitel 2.6), für die Bilanzierung der Radioaktivität am Ende eines Versuches und zur Eichung des Radioaktivitäts-Gas-Detektors (siehe Kapitel 2.9.4.2).

Für die Überprüfung der Stammlösung wurden in den Messungen 100 µl eingesetzt, für die Eichung des Gasdetektors 100, 200 und 500 µl der Stammlösung. Für die Bilanzierung der Radioaktivität wurde 1 ml der Bodensuspension entnommen und in Eppendorf-Reaktionsgefäßen 10 min bei 13000 UpM abzentrifugiert. 100 µl des Überstandes wurden für die Szintillationsmessung verwendet. Die Proben wurden zu 15 ml der Szintillationsflüssigkeit Quickzint 501 (Zinsser, Frankfurt) gegeben. Das Gemisch wurde vorsichtig geschüttelt, um Blasenbildung zu vermeiden. Die Radioaktivität im Gemisch wurde anschließend im Szintillationsmessgerät Beckmann LS 6500 (München) gemessen und um den Nullwert der Szintillationsflüssigkeit korrigiert.

2.9.4.2 Analyse von ^{14}C -Gasen

Für die Messung von radioaktivem CH_4 und CO_2 wurde ein Gaschromatograph (GC) mit Radioaktivitäts-Gas-Detektor (RAGA) benutzt, so dass der Gasstrom parallel im Flammenionisationsdetektor und im RAGA gemessen werden konnte. Die Anlage bestand aus einem in Kapitel 2.9.1 beschriebenen GC und einem RAGA Typ IM 2026/2028 der Firma Raytest (Straubenhardt).

Zählrohr: Durchflusszählrohr, 10 ml Volumen

Quenchgas: Methan

Nachweisgrenze: ungefähr 1500 dpm/ml

Die Auswertung erfolgte computergesteuert mit dem Messprogramm "raytest Gina" der Firma Nuclear Interface (Münster).

Der GC mit RAGA wurde mit Hilfe eines ^{14}C -Bicarbonatstandards geeicht. 100, 200 und 500 μl eines Standards wurden dazu jeweils in eine Serumflasche mit einem Volumen von 120 ml gefüllt. Die Serumflaschen wurden zuvor mit 10 ml Wasser befüllt, verschlossen und mit N_2 gespült. Durch Zugabe von 1 ml 1 M H_2SO_4 wurde das gelöste Bicarbonat als gasförmiges CO_2 freigesetzt, das im Anschluss im Gaschromatographen analysiert wurde. Parallel wurde der Standard wie unter Kapitel 2.9.4.1 beschrieben im Szintillationszähler gemessen, so dass eine Eichung der gemessenen Flächeneinheiten gegen die Radioaktivität des Gases möglich war.

2.9.5 Bestimmung reduzierender Zucker

Die Konzentration reduzierender Zucker wurde mit dem PAHBAH (p-Hydroxybenzoesäurehydrazid) Test nach Lever (1973) bestimmt. Das PAHBAH Reagenz musste vor dem Test aus folgenden Lösungen frisch angesetzt werden:

Lösung 1: 0,5 M Trinatriumacetat

Lösung 2: 1,0 M Na_2SO_3

Lösung 3: 0,2 M $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$

Lösung 4: 5,0 M NaOH

Je 10 ml der Lösungen 1 bis 4 wurden in einem 100-ml-Messkolben in der Reihenfolge 1 bis 4 unter ständigem Rühren gemischt und 50 ml H_2O zugesetzt. Nach der Zugabe von 1,52 g p-Hydroxybenzoesäurehydrazid (0,1 M Endkonzentration) wurde mit Wasser auf 100 ml aufgefüllt.

Vor dem Einsatz im Test mussten die Proben aufgetaut und abzentrifugiert (20 min, 13000 UpM, 4 °C) werden. 100 µl des Überstandes wurden zu 1 ml frisch angesetztes PAHBAH Reagenz gegeben. Die Proben wurden anschließend für 5 min in einem kochenden Wasserbad erhitzt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur konnte die Extinktion bei 420 nm im Spektrophotometer Hitachi U-1100 (Colora Messtechnik GmbH, Lorch) gemessen werden.

Zur Erstellung der Eichgeraden wurden Glucoselösungen verschiedener Konzentrationen von 0,1 bis 0,5 mM benutzt. Die Bestimmung der reduzierenden Zucker war in einem Bereich von 0 bis 10 mM linear.

2.9.6 pH-Wert

Der pH-Wert der Proben wurde nach der Zentrifugation (siehe Kapitel 2.4.2) im Überstand mit einem digitalen pH-Meter (Microprozessor pH Meter 539, Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH, Weilheim) mit einer pH-Sonde (InLab 427, pH 2 bis 11, Fa. Mettler Toledo, Gießen) bestimmt.

2.9.7 Trockengewichtsbestimmung

Für die Bestimmung des Trockengewichtes (TG) von Stroh und Boden wurden die Proben in Porzellanschälchen über Nacht bei 105 °C getrocknet. Für die Bestimmung des TG des Bodens wurden jeweils 10 ml Bodensuspension eingesetzt, bei der Bestimmung des TG des Strohs das Stroh aus einem Ansatz.

2.10 Berechnungen

2.10.1 Konzentrationsangaben von Gasen

Die Mischungsverhältnisse der Gase CH₄, CO₂ und H₂ wurden nach der Messung im Gaschromatographen anhand der Eichgase mit der Einheit "ppm_v" angegeben. In den Ergebnissen und für weitere Berechnungen wurden im allgemeinen Drücke (in "Pa" oder "bar") angegeben. Bei einem Gesamtdruck von 1 bar oder bei Mischungsverhältnissen, die auf 1 bar korrigiert wurden, wie es hier mit Hilfe der "pressure-lock"-Spritzen der Fall war, entspricht 1 ppm_v einem Druck von 10 Pa oder 1*10⁻⁶ bar.

CH₄ und CO₂ wurden außerdem in Stoffmengen angegeben (μmol). Für die Umrechnung wurde die Zustandsgleichung idealer Gase benutzt:

$$n = (p \times V) / (R \times T)$$

mit	n:	Stoffmenge [mol]	
	p:	Druck des Gases [bar]	
	V:	Volumen des Gasraumes im Reaktionsgefäß [l]	
	R:	Allgemeine Gaskonstante	(0,083144 l bar K ⁻¹ mol ⁻¹)
	T:	Temperatur [K]	(25 °C = 298,15 K)

2.10.2 Produktionsraten

Die Produktionsraten von Gasen oder gelösten Stoffen wurden aus den Stoffmengen der entsprechenden Substanz in einem Ansatz berechnet. Bei einer Auftragung der Stoffmenge gegen die Inkubationszeit entsprach die Produktionsrate der Steigung der Regressionsgeraden, die durch die Werte gelegt wurde. Die Raten sind angegeben als Stoffmenge pro Zeiteinheit und Ansatz.

2.10.3 Massenbilanzierung

Bei der Massenbilanzierung wurde das CH₄, das theoretisch aus Gärungsprodukten gebildet werden könnte, mit dem CH₄, das tatsächlich in Kontrollen gebildet wurde, verglichen. Sowohl die Angabe absoluter Mengen als auch Prozentangaben (% des tatsächlich gebildeten Methans) wurden hierbei verwendet.

Die Intermediate wurden für die Massenbilanzierung anhand der Stöchiometrie der syntrophen Abbauege (siehe Tabelle 2-4) in Äquivalente Methan umgeformt. Zur Berechnung wurde stets die absolute Stoffmenge pro Ansatz eingesetzt.

Tabelle 2-4: Stöchiometrie der Methanogenese und des syntrophen Abbaus verschiedener organischer Säuren mit den aus den einzelnen Reaktionen resultierenden Äquivalenten CH₄.

Gärungs- produkte	Reaktion	gebildete Äquivalente CH ₄ pro Reaktion*
<u>syntropher Abbau</u>		
Propionat	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COO}^- + 2 \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CH}_3\text{COO}^- + \text{CO}_2 + 3 \text{H}_2$	1 ³ / ₄
Isobutyrat	$\text{CH}_3\text{CH}(\text{CH}_3)\text{COO}^- + 2 \text{H}_2\text{O} \rightarrow 2 \text{CH}_3\text{COO}^- + \text{H}^+ + 2 \text{H}_2$	2 ¹ / ₂
Butyrat	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_2\text{COO}^- + 2 \text{H}_2\text{O} \rightarrow 2 \text{CH}_3\text{COO}^- + \text{H}^+ + 2 \text{H}_2$	2 ¹ / ₂
Isovalerat	$\text{CH}_3\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{COO}^- + \text{CO}_2 + 2 \text{H}_2\text{O}$ $\rightarrow 3 \text{CH}_3\text{COO}^- + 2 \text{H}^+ + 2 \text{H}_2$	3 ¹ / ₄
Valerat	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_3\text{COO}^- + 4 \text{H}_2\text{O} \rightarrow 2 \text{CH}_3\text{COO}^- + \text{CO}_2 + \text{H}^+ + 5 \text{H}_2$	3 ¹ / ₄
Caproat	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{COO}^- + 2 \text{H}_2\text{O} \rightarrow 3 \text{CH}_3\text{COO}^- + 2 \text{H}^+ + 4 \text{H}_2$	4
<u>Methanogenese</u>		
CO ₂ /H ₂	$\text{CO}_2 + 4 \text{H}_2 \rightarrow 2 \text{H}_2\text{O} + \text{CH}_4$	1
Acetat	$\text{CH}_3\text{COO}^- + \text{H}^+ \rightarrow \text{CH}_4 + \text{CO}_2$	1

* bei vollständigem Abbau der Substrate zu CH₄

Die Bilanzierung wurde zum einen für die Versuche durchgeführt, in denen die Methanogenese gehemmt wurde und sich daraufhin die Intermediate ansammelten. Die Massenbilanzierung zeigte, welchen Anteil die Intermediate an der Methanbildung hatten. Die Mengen der Intermediate berechneten sich aus den Konzentrationen in den gehemmten Ansätzen minus den Konzentrationen in den ungehemmten Kontrollen. Die Menge des tatsächlich gebildeten CH₄ wurde dagegen aus den Konzentrationen in den Kontrollen minus denen in den gehemmten Ansätzen berechnet.

Außerdem wurden anhand der Massenbilanzierung die Mengen CH₄ in den Ansätzen, in denen Stroh und Boden getrennt inkubiert wurden (siehe Kapitel 2.8.1), verglichen. Die Gärungsprodukte, die sich in den Strohansätzen ansammelten, wurden hierfür in das CH₄ umgerechnet, das theoretisch aus ihnen gebildet werden könnte, so dass ein Vergleich mit dem tatsächlich gebildeten CH₄ möglich war.

2.10.4 Thermodynamische Berechnungen

Die freie Reaktionsenthalpien (ΔG) unter Standardbedingungen verschiedener Reaktionen des syntrophen Abbaus von Gärungsprodukten, der Homoacetogenese und der Methanogenese wurde aus den freien Standardenthalpien (ΔG^0) der Reaktionen (Tabelle 2-5) und den Konzentrationen der beteiligten Substrate und

Produkte berechnet (Conrad *et al.* 1986, Rothfuss und Conrad 1993, Chin und Conrad 1995). Dabei wurden folgende Reaktion und Gleichung zugrunde gelegt (Thauer *et al.* 1977):

$$a A + b B \rightarrow c C + d D$$

$$\Delta G = \Delta G^0 + R \cdot T \cdot \ln \left(\frac{[C]^c \cdot [D]^d}{[A]^a \cdot [B]^b} \right)$$

$$= \Delta G^0 + 2,48 \text{ kJ mol}^{-1} \cdot \ln \left(\frac{[C]^c \cdot [D]^d}{[A]^a \cdot [B]^b} \right)$$

mit $R = 8,314 \cdot 10^{-3} \text{ kJ mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$
 $T = 298,15 \text{ K (25 °C)}$
 $\Delta G^0 = \Sigma G_f^0 \text{ (Produkte)} - \Sigma G_f^0 \text{ (Substrate)}$

Die freien Standardenthalpien der Reaktionen wurden aus den freien Bildungsenthalpien (G_f^0) der Substrate und Produkte der Reaktionen berechnet. Für die freien Bildungsenthalpien wurden Literaturwerte benutzt (Thauer *et al.* 1977, Stieb und Schink 1986, Wu *et al.* 1996).

Tabelle 2-5: Reaktionen der H_2 -Produktion im syntrophen Abbau von Gärungsprodukten, der Homoacetogenese und der Methanogenese und die freie Reaktionsenthalpie (ΔG^0) unter Standardbedingungen.

Reaktion	ΔG^0 [kJ/mol]*
<u>syntropher Abbau</u>	
$CH_3CH_2COO^- + 2 H_2O \rightarrow CH_3COO^- + CO_2 + 3 H_2$	+ 71.667
$CH_3CH(CH_3)COO^- + 2 H_2O \rightarrow 2 CH_3COO^- + H^+ + 2 H_2$	+ 90.146
$CH_3(CH_2)_2COO^- + 2 H_2O \rightarrow 2 CH_3COO^- + H^+ + 2 H_2$	+ 88.166
$CH_3CH(CH_3)CH_2COO^- + CO_2 + 2 H_2O \rightarrow 3 CH_3COO^- + 2 H^+ + 2 H_2$	+ 64.887
$CH_3(CH_2)_3COO^- + 4 H_2O \rightarrow 2 CH_3COO^- + CO_2 + H^+ + 5 H_2$	+ 159.873
<u>Methanogenese</u>	
$CO_2 + 4 H_2 \rightarrow 2 H_2O + CH_4$	- 130.747
$CH_3COO^- + H^+ \rightarrow CH_4 + CO_2$	- 75.699
<u>Homoacetogenese</u>	
$4 H_2 + 2 CO_2 \rightarrow CH_3COO^- + 2 H_2O + H^+$	- 55.048

* Die ΔG^0 Werte wurden berechnet nach Thauer *et al.* 1977, mit Ausnahme der Berechnungen mit Isobutyrat (Wu *et al.* 1996) oder Isovalerat (Stieb and Schink 1986). Die ΔG^0 Werte wurden entsprechend der gezeigten Stöchiometrie berechnet.

3 Ergebnisse

3.1 Methodenentwicklung

3.1.1 Inkubation von Reisstroh in Gasesäckchen

Um das Reisstroh nach einer bestimmten Inkubationszeit wieder aus den Ansätzen entfernen zu können, wurde dieses Stroh in Gasesäckchen eingenäht. Ein Vergleich von Ansätzen, in denen Stroh lose oder in Gasesäckchen zugegeben wurde, zeigte, dass die Konzentrationen von H_2 , CH_4 und CO_2 im Laufe der Inkubation in den verschiedenen Ansätzen jeweils gleich waren, wie es in Abbildung 3-1 für die Zugabe von 0,5 g Stroh auf 40 g Reisfeldboden dargestellt ist. Die Ergebnisse wurden durch vergleichbare Ansätze mit 0,1; 0,2; 0,4 bzw. 0,8 g Stroh (nicht gezeigt) bestätigt. Ein Einfluss der Gasesäckchen auf den methanogenen Abbau des Strohs konnte daher ausgeschlossen werden.

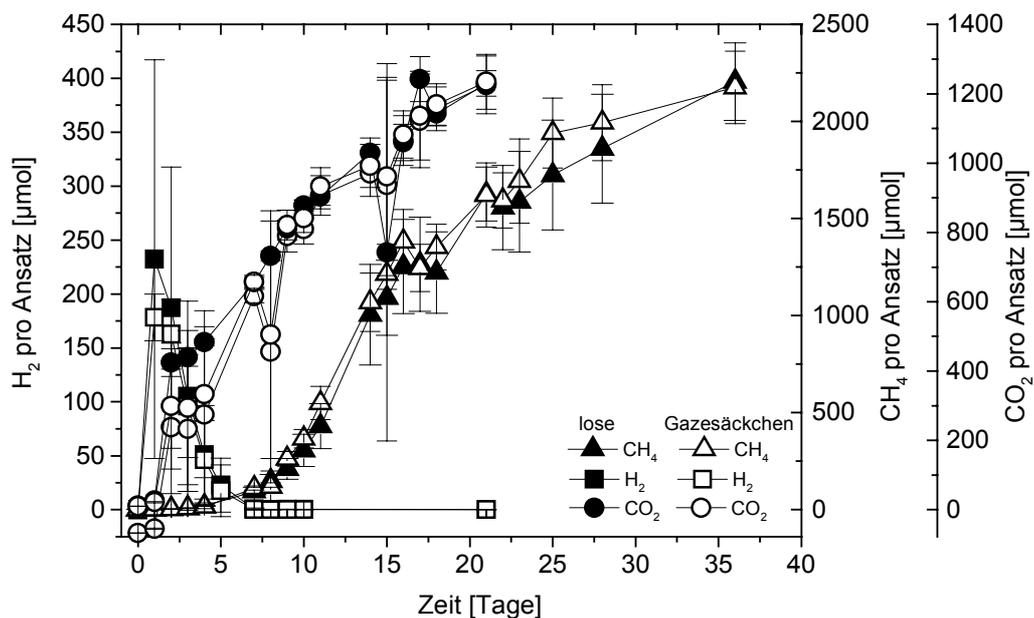


Abbildung 3-1: Konzentration von H_2 , CO_2 und CH_4 in Ansätzen, in denen das Reisstroh lose (geschlossene Symbole) oder eingenäht in Gasesäckchen (offene Symbole) zugegeben wurde. Alle Angaben pro Ansatz mit 40 g Reisfeldboden und 0,5 g Reisstroh vom Stiel. (n = 3, Mittelwert \pm Standardabweichung)

3.1.2 Hemmung der Zuckeraufnahme in die Zellen durch Toluol

Bei der Zugabe des Hemmstoffes Toluol sammelten sich die bei der Hydrolyse freigesetzten Zucker im Porenwasser an, da sie aufgrund der Wirkung des Toluols nicht mehr in die Zellen aufgenommen werden konnten. Um eine vollständige Hemmung sicher stellen zu können, wurde die Wirkung verschiedener Toluolkonzentrationen in geschüttelten und stehenden Ansätzen getestet (Tabelle 3-1).

Tabelle 3-1: Freisetzung reduzierender Zucker nach Zugabe des Hemmstoffes Toluol in verschiedenen Konzentrationen in stehenden und geschüttelten Ansätzen nach der Inkubation von Reisstroh in Reisfeldboden für 1 bzw. 7 Tage.

Testbedingungen ¹	Freisetzung reduzierender Zucker [$\mu\text{mol h}^{-1}$] nach Inkubation von Reisstroh in Boden für	
	1 Tag	7 Tage
3 % Toluol, stehend	$-13,5 \pm 5,8$	$0,4 \pm 0,01$
10 % Toluol, stehend	$-6,8 \pm 2,0$	$0,7 \pm 0,001$
3 % Toluol, geschüttelt mit 120 μP^2	$3,3 \pm 0,5$	$0,8 \pm 0,1$
10 % Toluol, geschüttelt mit 120 μP^2	$2,0 \pm 0,6$	$0,8 \pm 0,1$
ohne Toluol, stehend	$-16,6 \pm 4,6$	n.b. ³
halber Ansatz, 3 % Toluol, geschüttelt mit 120 μP^2	n.b. ³	$0,8 \pm 0,1$

Negative Werte zeigen eine Abnahme der Zuckerkonzentration. Angaben beziehen sich auf 40 g Reisfeldboden und 0,5 g Reisstroh vom Stiel pro Ansatz mit Ausnahme des halben Ansatzes mit 20 bzw. 0,25 g. ($n = 3$, Mittelwert \pm Standardabweichung)

¹ alle Ansätze bei 25 °C im Dunkeln; ² Horizontalschüttler; ³ n.b. = nicht bestimmt

Es zeigte sich, dass die Ansätze geschüttelt werden mussten, um auch bei hohen Hydrolyseraten, wie es nach einem Tag Inkubation der Fall war, eine vollständige Hemmung zu erzielen (Tabelle 3-1). In den geschüttelten Ansätzen stieg die Freisetzung der Zucker auch bei höheren Toluolkonzentrationen als 3 % nicht weiter an, so dass davon ausgegangen werden kann, dass hier eine vollständige Hemmung erreicht war. Damit die Ansätze beim Schütteln besser durchmischt werden konnten, wurden die Ansätze um die Hälfte verkleinert. Dies zeigte bei den geringen Hydrolyseraten nach 7 Tagen Inkubation aber keine Wirkung. Da eine gute Durchmischung in Ansätzen mit hoher Hydrolyseraten offensichtlich aber entscheidend für die Hemmwirkung war, wurde das kleinere Probevolumen für weitere Ansätze beibehalten. Diese Ansätze wurden mit 3 % Toluol versetzt und bei 120 μP geschüttelt.

3.1.3 Aktivitätstests für hydrolytische Enzyme mit MUF-Substraten

Die Aktivitäten der hydrolytischen Enzyme Xylosidase, Glucosidase und Exoglucanase wurden durch Zugabe von künstlichen Substraten getestet, die den Fluoreszenzfarbstoff MUF (Methylumbelliferon) enthielten. Für jedes der dabei eingesetzten Substrate MUF-Glucosid (Glucosidase), MUF-Xylosid (Xylosidase) und MUF-Cellobiosid (Exoglucanase) wurde die Substratsättigung (Abbildung 3-2) und das maximal einsetzbare Probevolumen (Tabelle 3-2) bestimmt.

Die Substratsättigung, d. h. die Konzentration, bei der die maximale Aktivität erreicht ist und die daher als Substratkonzentration für die Enzymtests gewählt wurde, lag bei MUF-Xylosid und MUF-Glucosid bei 3 mM, bei MUF-Cellobiosid bei 4 mM (Abbildung 3-2).

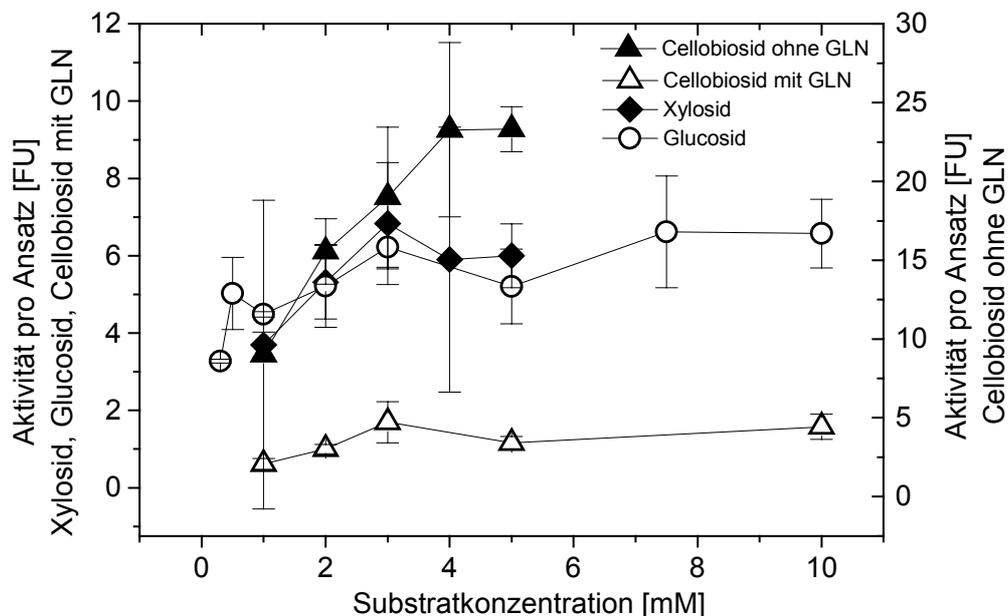


Abbildung 3-2: Abhängigkeit der Enzymaktivität (FU=relative Fluoreszenzeinheiten) von der Konzentration der eingesetzten Substrate MUF-Xylosid, MUF-Glucosid bzw. MUF-Cellobiosid (mit und ohne Gluconolacton = GLN) in Ansätzen mit 1,5 g Boden und 0,2 g Stroh. (n = 3, Mittelwert \pm Standardabweichung)

Wurde ein größeres Probevolumen als 2 ml eingesetzt, stieg die gemessene Aktivität nicht weiter an (Tabelle 3-2). Da die Proben möglichst repräsentativ sein sollten, entsprachen die Ansätze für die weiteren Versuche diesem größtmöglichen Volumen.

Tabelle 3-2: Abhängigkeit der Aktivität von Xylosidase, Glucosidase und Exoglucanase vom Volumen der Probe mit Reisfeldboden und Reisstroh.

Reisfeldboden	Probe		Xylosidase	Enzymaktivität [FU] ¹	
	Reisstroh ²	Volumen ³		Glucosidase	Exoglucanase
0,375 g	0,005 g	0,5 ml	3,6 ± 0,6	3,2 ± 0,6	4,4 ± 1,0
0,75 g	0,01 g	1 ml	6,1 ± 1,6	4,1 ± 0,7	7,5 ± 2,0
1,5 g	0,02 g	2 ml	7,4 ± 1,1	7,3 ± 1,0	8,2 ± 1,5
2,25 g	0,03 g	3 ml	4,5 ± 1,0	5,7 ± 1,3	3,6 ± 1,5

¹ FU=relative Fluoreszenz des MUF; ² vom Stiel; ³ mit Boden und Wasser 1:1
(n = 3, Mittelwert ± Standardabweichung)

Für MUF-Xylosid musste neben der Substratkonzentration und dem Probenvolumen auch die optimale Inkubationszeit bestimmt werden. Die Freisetzung von MUF blieb über einen Zeitraum von 90 min linear (Abbildung 3-3). In Anlehnung an die Ansätze mit MUF-Glucosid wurden die Testansätze im Folgenden für 15 min inkubiert. Dass die Freisetzung von MUF aus MUF-Glucosid bzw. MUF-Cellobiosid über eine Inkubationszeitraum von 15 bzw. 90 min konstant war, hatten bereits frühere Versuche mit Reisfeldboden gezeigt (A. Fey, persönliche Mitteilung).

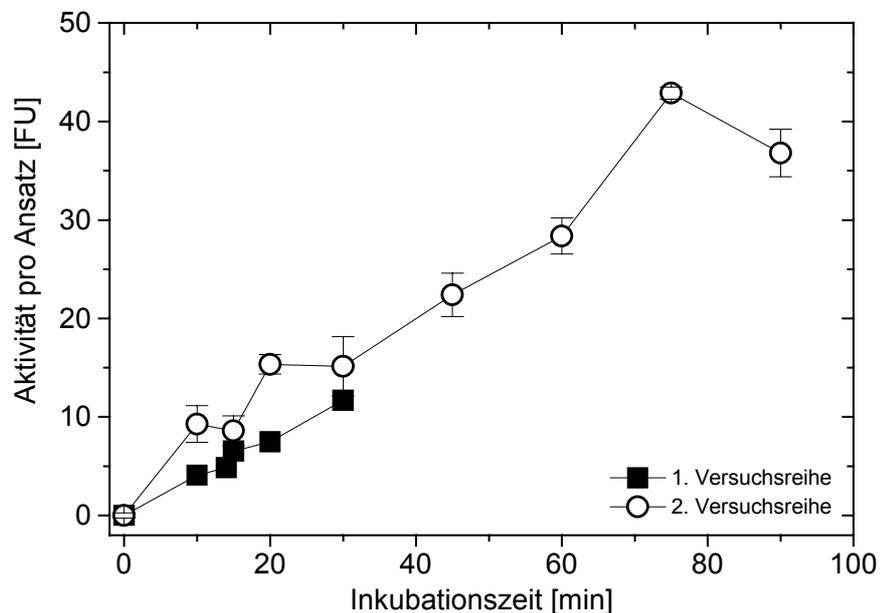


Abbildung 3-3: Abhängigkeit der Aktivität der Xylosidase (FU=relative Fluoreszenzeinheiten) von der Inkubationszeit, bestimmt mit MUF-Xylosid (3 mM) in zwei getrennten Versuchen. Alle Angaben pro Ansatz mit 1,5 g Reisfeldboden und 0,02 g Reisstroh vom Stiel. (n = 3, Mittelwert ± Standardabweichung)

MUF-Cellobiosid kann sowohl von der Exoglucanase wie auch von der Glucosidase gespalten werden. Um die Aktivität der Exoglucanase messen zu können, wurde Gluconolacton (GLN) als Hemmstoff für die Glucosidase eingesetzt. Die Enzymaktivitäten mit und ohne Zusatz von GLN wurden mit der Aktivität der Glucosidase (gemessen mit MUF-Glucosid) verglichen. Um die Aktivitäten der verschiedenen Enzyme vergleichen zu können, müssen die unterschiedlichen Inkubationszeiten in Enzymtests mit unterschiedlichen Substraten (Tabelle 2-2) berücksichtigt werden. Dazu wurden die Aktivitäten hier, anders als in den zuvor gezeigten Ergebnissen, pro Stunde angegeben. Die Enzymaktivität ohne GLN verlief während der Inkubation von Stroh in Boden ähnlich wie die Aktivität der Glucosidase, war aber niedriger als diese (Abbildung 3-4). Man kann daher nicht davon ausgehen, dass die Enzymaktivität ohne Zugabe von GLN die Summe der Aktivitäten der Glucosidase und der Exoglucanase darstellte. Das heißt auch, dass sich die Aktivität der Exoglucanase nicht berechnen ließe, wenn nur die Enzymaktivität bei Einsatz von MUF-Cellobiosid ohne Zugabe von GLN und die Aktivität der Glucosidase gemessen wurde.

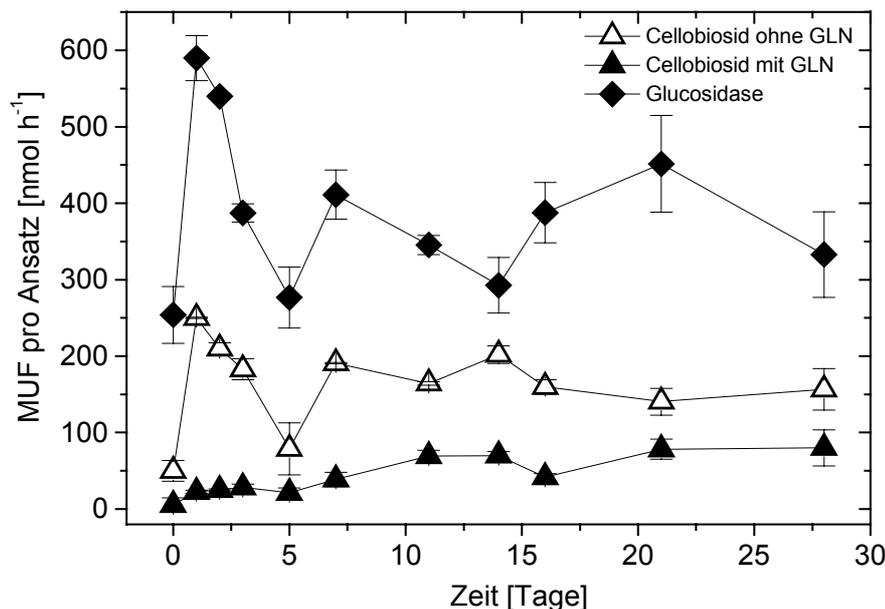


Abbildung 3-4: Aktivitäten der MUF-Cellobiosid spaltenden Enzyme mit und ohne Zugabe von Gluconolacton (40 mM) und der Glucosidase (bestimmt mit MUF-Glucosid). Alle Angaben pro Ansatz mit 1,5 g Reisfeldboden und 0,02 g Reisstroh vom Stiel. (n = 3, Mittelwert ± Standardabweichung)

Tests mit verschiedenen Konzentrationen von GLN zeigten, dass ab einer Konzentration von ungefähr 30 mM die Aktivität mit steigender GLN-Konzentration nicht weiter sank (Tabelle 3-3), d. h. die Glucosidase war vollständig gehemmt. In den weiteren Versuchen wurde eine 500 mM GLN-Lösung eingesetzt, was einer Konzentration von ungefähr 40 mM pro Ansatz entsprach.

Tabelle 3-3: Abhängigkeit der Aktivität der MUF-Cellobiosid spaltenden Enzyme von der Konzentration des Gluconolactons im Ansatz.

eingesetzte Lösung	Gluconolacton [mM]		Enzymaktivität [FU] ¹
		im Ansatz	
0		0	13,0 ± 1,4
100		7,9	5,0 ± 1,4
250		19,7	5,7 ± 0,7
400		31,6	3,8 ± 0,4
500		39,5	3,8 ± 0,4
1000		79,0	3,2 ± 1,0

Alle Angaben pro Ansatz mit 1,5 g Reisfeldboden und 0,02 g Reisstroh vom Stiel und 4 mM MUF-Cellobiosid. (n = 3, Mittelwert ± Standardabweichung)

¹ FU=relative Fluoreszenzeinheiten

3.1.4 Puffer für die Inkubation von Stroh nach der Trennung vom Boden

Für die Inkubation von Reisstroh ohne Boden wurden verschiedene Puffer getestet. Bei Einsatz von 50 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 7) sank der pH-Wert durch die gebildeten Fettsäuren auf ungefähr 4. In 6 mM Kaliumphosphatpuffer mit 30 mM NaHCO₃ oder 5 g CaCO₃ auf 50 ml lag der pH-Wert bei 6,6 bzw. 6,2. Ein Unterschied in der Bildung von CH₄, H₂ oder Fettsäuren war im Vergleich der beiden Puffer nicht erkennbar (Abbildung 3-5). Da der pH-Wert bei Einsatz von NaHCO₃ konstanter war, wurde dieser Puffer eingesetzt, wenn Stroh ohne Boden nach der Trennung weiterinkubiert wurde (siehe Kapitel 2.8.1).

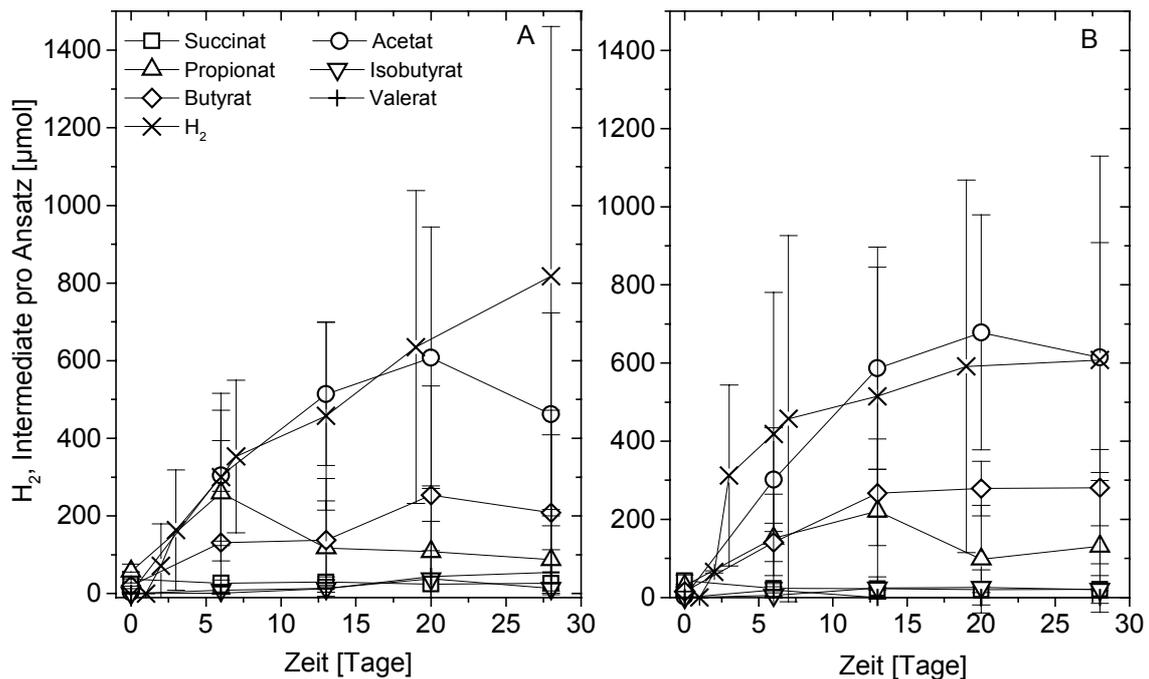


Abbildung 3-5: Konzentration von H_2 und Intermediaten in Ansätzen mit 0,5 g Reisstroh vom Stiel in 50 ml 6 mM Kaliumphosphatpuffer mit (A) 30 mM $NaHCO_3$ oder (B) 5 g $CaCO_3$ pro Ansatz. ($n = 3$, Mittelwert \pm Standardabweichung)

3.2 Fermentation und Methanogenese

Die Bildung von Fermentationsprodukten als Intermediate des anaeroben Abbaus und Methan und CO_2 als Endprodukte wurde während der Inkubation von Reisstroh in Reisfeldboden verfolgt, bis ein "steady state" mit konstanter Methanbildung erreicht war. Welchen Beitrag H_2/CO_2 und Acetat dabei zur Methanogenese leisteten, zeigte der Umsatz von radioaktiv markiertem Bicarbonat zu Methan. Durch die Hemmung der Methanogenese mit BES wurde außerdem die Beteiligung der Fermentationsprodukte an der Bildung des Methans untersucht. Das Reisstroh wurde in Stiel, Blattscheide und Blattspreite (Abbildung 1-2) unterteilt, da die unterschiedliche Zusammensetzung der Strohfraktionen möglicherweise einen Einfluss auf die Abbauprozesse hat.

3.2.1 Einfluss von Reisstroh auf die Bildung von Fermentationsprodukten und CH₄

Die Zugabe von Reisstroh zu Reisfeldboden führte zu einer verstärkten Bildung von H₂, CO₂ und CH₄ unabhängig davon, welche der drei Strohfraktionen eingesetzt wurde (Abbildung 3-6). Bei der Zugabe von Stroh vom Stiel der Reispflanzen war der Anstieg der Konzentrationen dabei im Vergleich zu den anderen Strohfraktionen am größten.

Der Wasserstoffpartialdruck stieg nur vorübergehend an und sank dann innerhalb von höchstens 7 Tagen wieder auf konstante Partialdrücke von 1,5 Pa in Ansätzen ohne Stroh bzw. 4,4 bis 6,0 Pa in Ansätzen mit Stroh ab (Abbildung 3-6 A). Nach einem verstärkten Anstieg der Konzentration in den ersten 4 Tagen wurde CO₂ mit konstanten Raten von 12 μmol d⁻¹ pro Ansatz (ohne Stroh), 75 μmol d⁻¹ pro Ansatz (Stiel), 38 μmol d⁻¹ pro Ansatz (Blattscheide) bzw. 47 μmol d⁻¹ pro Ansatz (Blattspreite) gebildet (Abbildung 3-6 B). In Ansätzen ohne Stroh sammelte sich CH₄ nach einer kurzen lag-Phase mit einer konstanten Rate von 10 μmol d⁻¹ pro Ansatz an (Abbildung 3-6 C). Bei der Zugabe von Reisstroh dagegen folgte auf die lag-Phase eine Phase mit starker Methanbildung von 82 bis 306 μmol d⁻¹ pro Ansatz. Ab Tag 17 stieg die Konzentration von CH₄ linear mit konstanten Raten von 83 μmol d⁻¹ pro Ansatz (Stiel), 42 μmol d⁻¹ pro Ansatz (Blattscheide) bzw. 77 μmol d⁻¹ pro Ansatz (Blattspreite) an (Abbildung 3-6 C).

Die höchste Wasserstoffkonzentration in den ersten 7 Tagen und die Bildungsraten von CH₄ und CO₂ im Zeitraum der stärksten Produktion waren direkt abhängig von der Menge des eingesetzten Strohs (vom Stiel) (Abbildung 3-7). Pro 0,1 g des eingesetzten Strohs stieg die maximalen Wasserstoffkonzentration dabei um 639 μmol pro Ansatz, die CH₄-Produktion um 400 μmol d⁻¹ pro Ansatz und die CO₂-Produktion um 58 μmol d⁻¹ pro Ansatz.

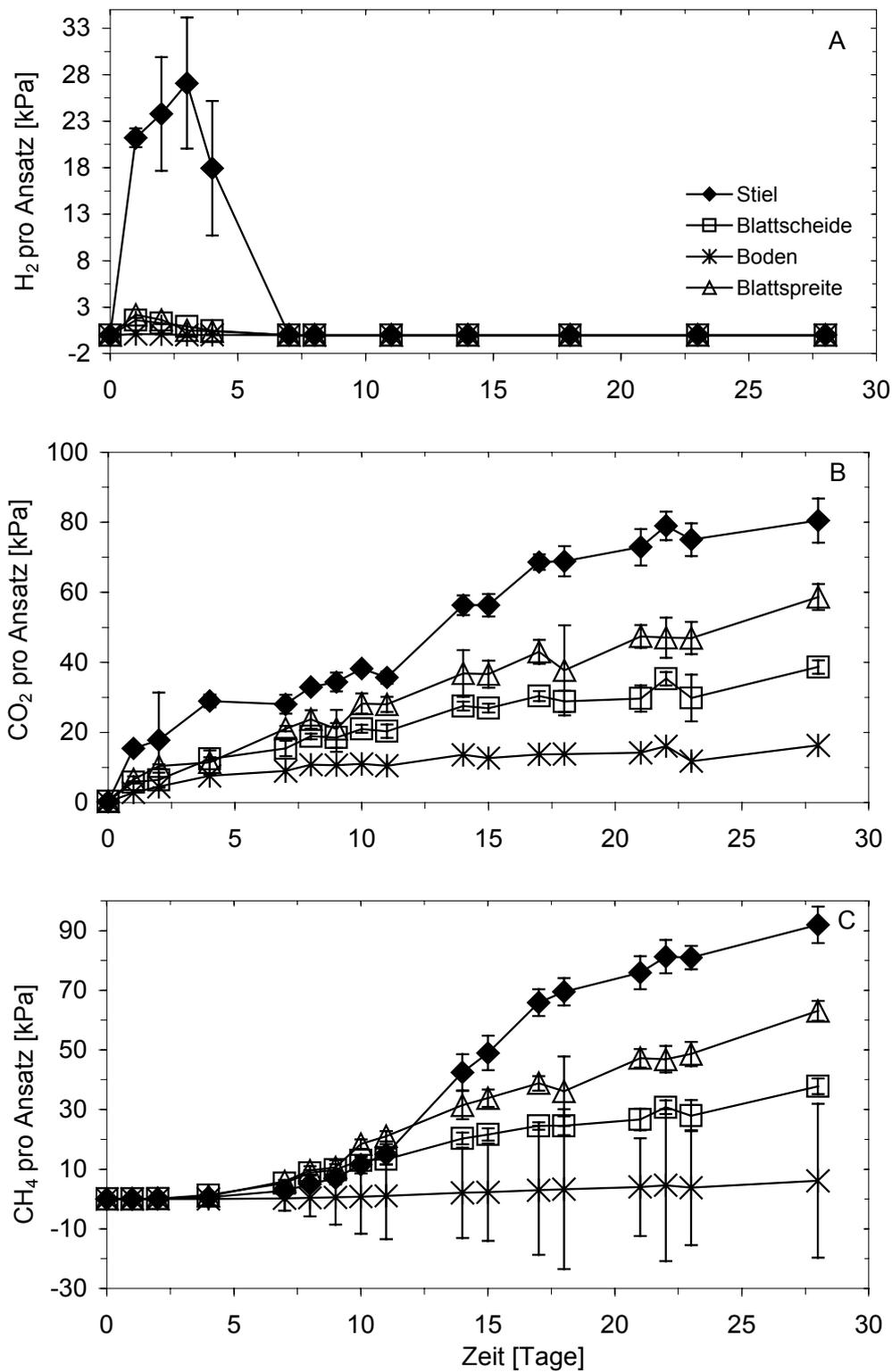


Abbildung 3-6: Einfluss verschiedener Fraktionen von Reisstroh auf die Bildung von (A) H₂, (B) CO₂ und (C) CH₄ im Vergleich zu Reisfeldboden ohne Stroh. Angaben beziehen sich auf 40 g Reisfeldboden und 0,5 g Reisstroh pro Ansatz. (n = 3, Mittelwert ± Standardabweichung)

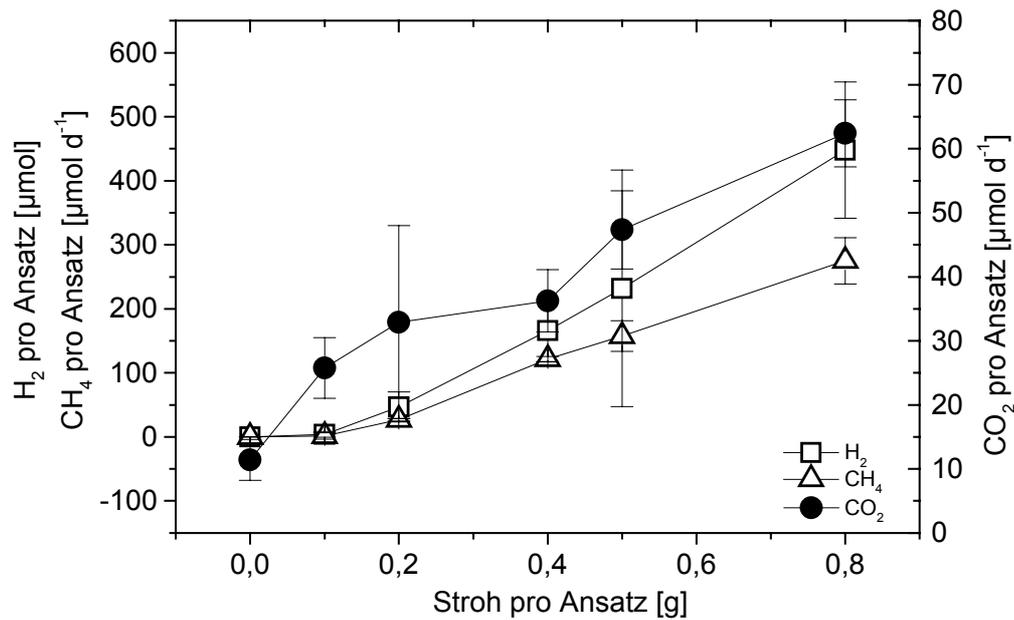


Abbildung 3-7: Einfluss der Menge des eingesetzten Strohs auf die Bildung von CH₄ und CO₂ im Zeitraum mit der höchsten Produktionsrate (Tag 10 bis 15) und die höchsten gemessenen Konzentrationen von H₂ während der Inkubation (alle Angaben pro Ansatz mit 40 g Reisfeldboden). (n = 3, Mittelwert ± Standardabweichung)

Folgende Intermediate wurden während der Inkubation von Reisstroh in Reisfeldboden gefunden: Acetat, Propionat, Butyrat, Caproat, Isobutytrat, Isovalerat und Valerat. Abbildung 3-8 zeigt die Konzentrationen dieser Intermediate bei der Inkubation von Stroh vom Stiel in Boden im Vergleich zu Boden ohne Stroh. Zunächst stiegen die Konzentrationen an, sanken dann aber wieder, bis sie konstante Werte nahe dem Detektionslimit von 10 µM erreichten. Ungefähr im selben Zeitraum erreichte auch die CH₄-Produktion die lineare Phase (Tag 18 bis 21). Die Konzentrationen der Intermediate verhielten sich während der Inkubation in Ansätzen mit anderen Strohfraktionen ebenso wie in den Ansätzen mit Stroh vom Stiel. Die maximalen Konzentrationen der gebildeten Intermediate waren jedoch niedriger (Tabelle 3-4).

Der Vergleich der höchsten gefundenen Konzentrationen zeigte, dass sich Acetat in allen Ansätzen am stärksten ansammelte (Tabelle 3-4). Während aber in Ansätzen mit Stielstroh Butyrat das zweithäufigste Intermediat war, gefolgt von Caproat und Propionat, war es Propionat in Ansätzen mit Stroh der Blattscheide bzw. der Blattspreite, gefolgt von Caproat und Butyrat. In Ansätzen ohne Stroh waren die Konzentrationen von Acetat, Butyrat und Propionat im Vergleich zu den Ansätzen mit Stroh geringer, Valerat war kaum messbar, und Caproat, Isobutytrat und Isovalerat wurden gar nicht gefunden (Tabelle 3-4).

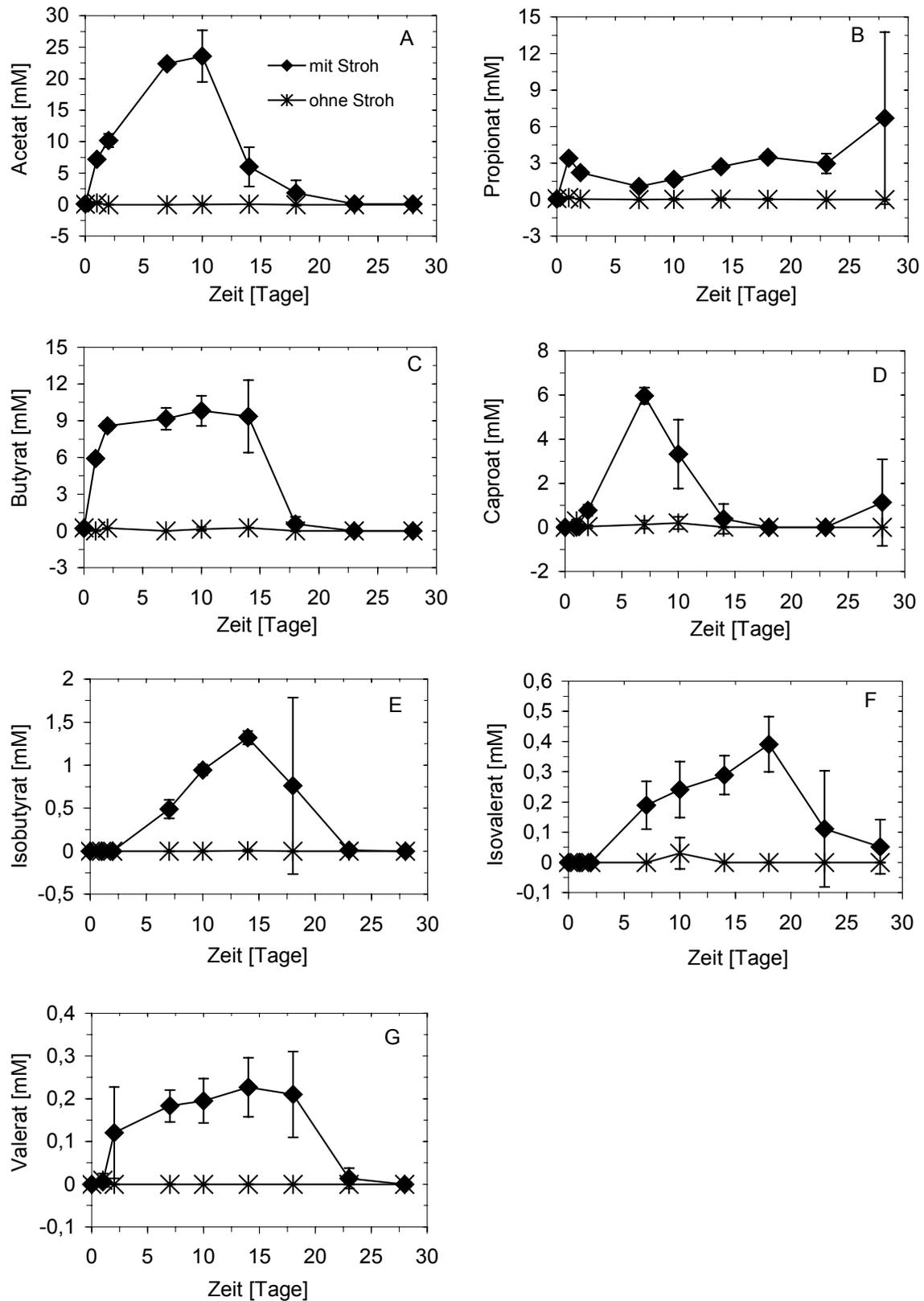


Abbildung 3-8: Einfluss von Reisstroh vom Stiel auf die Bildung verschiedener Intermediate (A-G) im Vergleich zu Reisfeldboden ohne Stroh. Angaben beziehen sich auf 40 g Reisfeldboden und 0,5 g Reisstroh pro Ansatz. (n = 3, Mittelwert \pm Standardabweichung)

Tabelle 3-4: Maximale Konzentrationen der Intermediate während des Abbaus verschiedener Fraktionen des Reisstrohs im Vergleich zu Reisfeldboden ohne Stroh (innerhalb der ersten 28 Tage der anaeroben Inkubation).

Intermediat	maximale Konzentration während der ersten 28 Tage [mM]			
	Stiel ¹	Blattscheide	Blattspreite	Boden ¹
Acetat	23,6	4,1	9,3	0,25
Propionat	3,4	3,2	4,3	0,18
Isobutyrat	1,3	0,04	0,1	< 0,01
Butyrat	9,8	0,5	0,8	0,3
Isovalerat	0,4	0,03	0,1	< 0,01
Valerat	0,2	0,1	0,03	0,01
Caproat	6,0	1,7	1,7	< 0,01

Angaben beziehen sich auf 40 g Reisfeldboden und 0,5 g Reisstroh pro Ansatz.

¹ Daten werden in Abbildung 3-8 gezeigt.

Der pH-Wert sank in allen Ansätzen mit und ohne Stroh am Anfang der Inkubation auf pH 5,3 bis 5,7 ab. Innerhalb der folgenden 7 bis 14 Tage stieg er auf 6,7 bis 6,9 an, wobei in Ansätzen mit Stielstroh der Anstieg langsamer als in den anderen Ansätzen war (Abbildung 3-9).

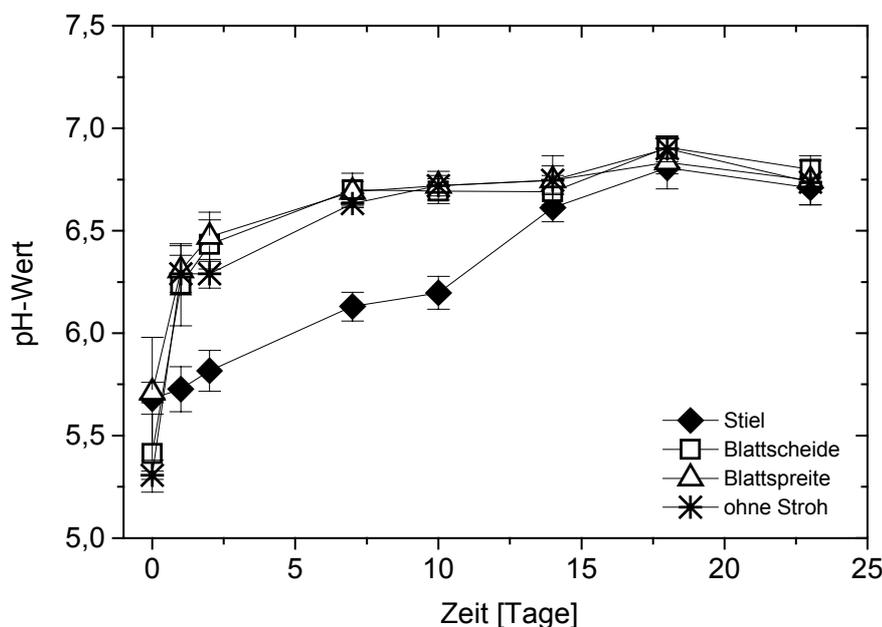


Abbildung 3-9: Einfluss verschiedener Strohfraktionen auf den pH-Wert im Porenwasser im Vergleich zu Ansätzen mit Reisfeldboden ohne Stroh in Ansätzen mit 40 g Boden und 0,5 g Stroh. (n = 3, Mittelwert \pm Standardabweichung)

3.2.2 Bildung von CH₄ aus H₂/CO₂

Der Anteil des Gesamtmethans, der aus H₂/CO₂ gebildet wurde, der sogenannte f-Faktor (f_{H₂}), wurde für Reisfeldboden mit und ohne Zusatz von Reisstroh bestimmt, nachdem die Methanbildung konstante Werte erreicht hatte (28 Tage). Nach der Zugabe von NaH¹⁴CO₃ wurden radioaktives und nicht-radioaktives CH₄ und CO₂ über einen Zeitraum von 25 Tagen gemessen, bis der daraus berechnete f-Faktor (Kapitel 2.6) konstant war. Dies war 19 Tage nach Zugabe des NaH¹⁴CO₃ (Tag 44 der Inkubation) der Fall. In Ansätzen mit Stroh lag der Anteil des CH₄ aus H₂/CO₂ bei 24 bis 27 %, ohne Stroh dagegen nur bei 11 % (Tabelle 3-5). Da keine anderen direkten Vorläufer des CH₄ wie Methanol oder Formiat nach der Hemmung der Methanogenese gefunden wurden, kann davon ausgegangen werden, dass das restliche CH₄ aus Acetat gebildet wurde.

Tabelle 3-5: Anteil an CH₄, das beim Abbau verschiedener Strohfraktionen über H₂/CO₂ (f-Faktor) oder Acetat gebildet wurde, im Vergleich zu Ansätzen mit Reisfeldboden ohne Stroh.

CH ₄ gebildet über	Stiel	mit Reisstroh von Blattscheide	Blattspreite	ohne Stroh
H ₂ /CO ₂	24 ± 4 %	25 ± 5 %	27 ± 4 %	11 ± 3 %
Acetat	76 ± 4 %	75 ± 5 %	73 ± 4 %	89 ± 3 %

Angaben beziehen sich auf 40 g Reisfeldboden und 0,5 g Reisstroh pro Ansatz.
(n = 3, Mittelwert ± Standardabweichung)

3.2.3 Hemmung der Methanogenese mit BES

Die Methanogenese wurde durch die Zugabe von BES gehemmt, nachdem sie konstante Raten erreicht hatte (28 Tage nach Beginn der Inkubation). Durch die steigende Konzentration des direkten Methanvorläufers H₂ (Abbildung 3-10 A) wurde der syntrophe Abbau der Gärungsprodukte aus thermodynamischen Gründen gehemmt. Die daraus resultierende Anhäufung der Gärungsprodukte (Abbildung 3-11) zeigte, welche Verbindungen an der Methanbildung beteiligt waren. Darüber hinaus konnte durch eine Massenbilanzierung (siehe Kapitel 2.10.3) auf den Anteil der Intermediate an der Methanbildung zurückgeschlossen werden (Tabelle 3-6).

3.2.3.1 Einfluss der Hemmung mit BES auf die Bildung von CH₄ und Intermediaten

Der Einfluss, den die Hemmung auf die Bildung von CH₄, H₂, CO₂ und der Intermediate hatte, ist in den folgenden Abbildungen (Abbildung 3-10 und 3-11) nur für Ansätze mit Reisstroh vom Stiel dargestellt. Ähnliche Ergebnisse wurden auch für die Ansätze mit den anderen Strohfraktionen und ohne Stroh erhalten.

Die Methanogenese wurde durch die Zugabe von BES vollständig gehemmt (Abbildung 3-10 C), während in den Kontrollen ohne den Hemmstoff eine konstante CH₄-Produktion zu beobachten war. Als Reaktion auf die Hemmung sammelte sich H₂ in den Ansätzen mit Stroh mit einer Rate von ungefähr 1 µmol d⁻¹ pro Ansatz an (Abbildung 3-10 A), in Ansätzen ohne Stroh mit einer Rate von ungefähr 0,01 µmol d⁻¹ pro Ansatz. Auf die Bildung von CO₂ hatte die Zugabe von BES dagegen nahezu keinen Einfluss (Abbildung 3-10 B).

Neben H₂ sammelten sich folgende Intermediate in den Ansätzen mit Stroh an, unabhängig davon, welche Strohfraktion zugegeben wurde: Acetat, Propionat, Butyrat, Isobutyrat, Isovalerat und Valerat. In Tabelle 3-6 sind die Mengen der Intermediate, die sich in den verschiedenen gehemmten Ansätzen im Vergleich zu den ungehemmten Kontrollen 21 Tage nach Zugabe des Hemmstoffes angesammelt hatten, zusammengefasst. In allen Ansätzen wurde Acetat in den höchsten Konzentrationen gefunden, gefolgt von Propionat, während die anderen Intermediate in viel geringerem Ausmaß gefunden wurden. Valerat war allerdings nicht in den Ansätzen mit Stroh von der Blattspreite nachweisbar (Tabelle 3-6) und wurde in den anderen Ansätzen mit einer Verzögerung von 9 Tagen angehäuft (Abbildung 3-11 F). Ein Anstieg der Konzentration von Caproat konnte nicht nachgewiesen werden, obwohl es, besonders in den Ansätzen mit Stielstroh, während der ersten 28 Tage der Inkubation gefunden wurde (Abbildung 3-8 und Tabelle 3-6). Ebenso wurde Butyrat nicht in Ansätzen ohne Stroh angehäuft, obwohl es zu Beginn der Inkubation messbar war (Tabelle 3-4 und 3-6). In diesen Ansätzen waren Acetat und Propionat die einzigen Intermediate, die sich nach der Zugabe von BES ansammelten (Tabelle 3-6). Trotz der Anhäufung organischer Säuren blieb der pH-Wert in den verschiedenen Ansätzen über den gesamten Zeitraum der Inkubation mit und ohne Zugabe von BES konstant bei 6,7 bis 6,9.

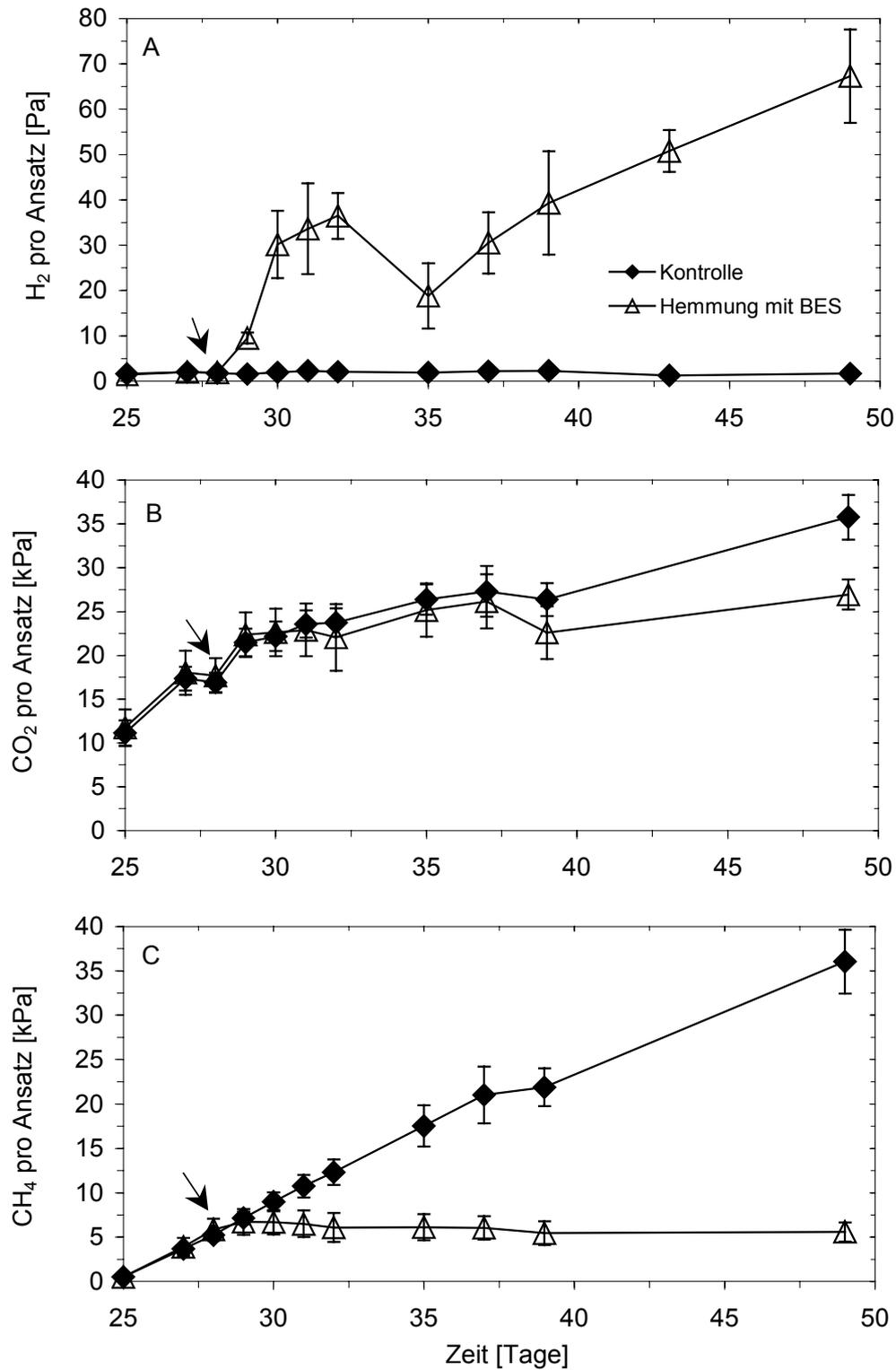


Abbildung 3-10: Änderung der Konzentrationen von (A) H₂, (B) CO₂ und (C) CH₄ bei der Hemmung der Methanogenese mit BES nach 28 Tagen Inkubation (Die Pfeile zeigen den Zeitpunkt der Zugabe von BES). Angaben beziehen sich auf 40 g Reisfeldboden und 0,5 g Reisstroh vom Stiel pro Ansatz. (n = 3, Mittelwert ± Standardabweichung)

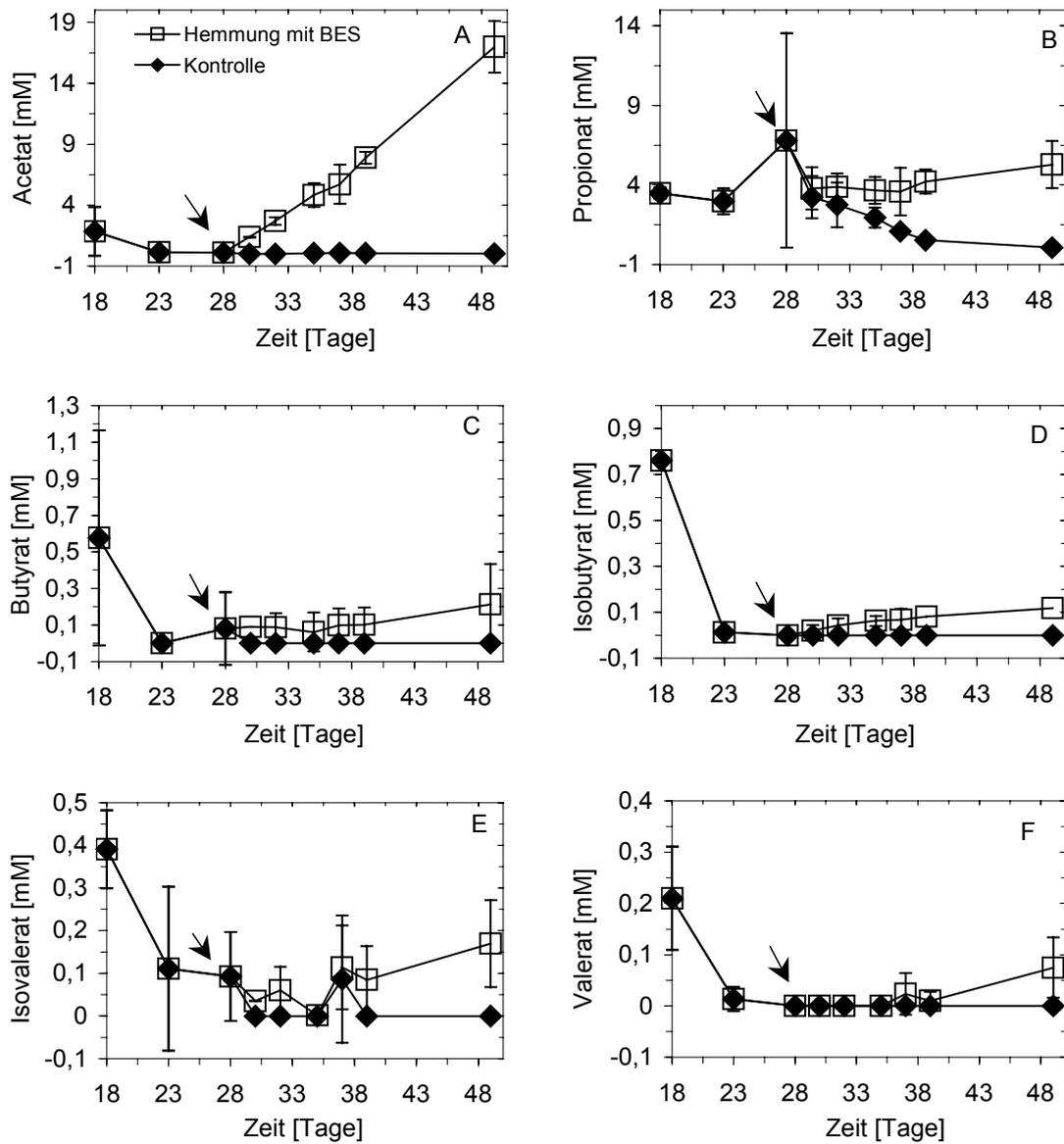


Abbildung 3-11: Änderung der Konzentrationen von verschiedenen Intermediaten (A-F) nach der Hemmung der Methanogenese mit BES nach 28 Tagen Inkubation (die Pfeile zeigen den Zeitpunkt der Zugabe von BES). Angaben beziehen sich auf 40 g Reisfeldboden und 0,5 g Reisstroh pro Ansatz. (n = 3, Mittelwert \pm Standardabweichung)

Tabelle 3-6: Intermediate, die sich nach der Zugabe von BES ansammelten, gemessen 21 Tage nach Zugabe des BES in verschiedenen Ansätzen, und CH₄ in den nicht gehemmten Kontrollen. Die Intermediate werden angegeben als absolute Gesamtmenge im Ansatz und als äquivalente Mengen Acetat, H₂ und CH₄, die bei vollständigem Abbau der Intermediate zu CH₄ gebildet würden.

Intermediate	Stiel ⁴	Blattscheide	Blattspreite	Boden
Gesamtmenge im Ansatz [μmol]				
H ₂ ¹	2,6	2,8	3,4	1,6
Acetat ¹	577,5	397,2	674,8	131,6
Propionat ¹	179,6	72,9	145,9	25,0
Butyrat ¹	7,2	10,5	13,5	0,0
Isobutyrat ¹	4,0	2,0	4,4	0,0
Isovalerat ¹	5,8	1,7	4,0	0,0
Valerat ¹	2,5	6,2	0,0	0,0
äquivalente Menge Acetat ²	796,2	510,9	864,4	156,5
äquivalente Menge H ₂ ²	605,5	286,0	496,6	76,5
äquivalente Menge CH ₄ ²	947,5	582,4	988,6	175,7
CH ₄ in der Kontrolle ³	1197,6	702,9	1229,9	157,5
äquivalente Mengen CH ₄ ² [% des CH ₄ in der nicht gehemmten Kontrolle]				
H ₂	0,1	0,1	0,1	0,2
Acetat	48,2	56,5	54,9	83,5
Propionat	26,2	18,2	20,8	27,7
Butyrat	1,5	3,7	2,7	0
Isobutyrat	0,8	0,7	0,9	0
Isovalerat	1,6	0,8	1,0	0
Valerat	0,7	2,9	0	0
Summe der Metabolite	79,1	82,8	80,4	111,5
über Acetat ⁵	84,0	87,7	87,4	89,1
über H ₂ ⁵	16,0	12,3	12,6	10,9

Angaben beziehen sich auf 40 g Reisfeldboden und 0,5 g Reisstroh pro Ansatz. Die Konzentrationen in den Ansätzen mit Stroh vom Stiel der Reispflanzen sind in den Abbildung 3-10 bzw. 3-11 dargestellt, die Daten für Ansätze mit den anderen Strohfraktionen und mit Boden ohne Stroh werden nicht gezeigt.

¹ Die Gesamtmengen entsprechen den Mengen in den gehemmten Ansätzen abzüglich der Mengen in den nicht gehemmten Kontrollen.

² Die äquivalenten Mengen Acetat, H₂ und CH₄ wurden für die Gesamtmenge aller Metabolite berechnet gemäß der Stöchiometrie des Abbaus zu CH₄ (Tabelle 2-4).

³ Die Gesamtmenge entspricht der Menge in den nicht gehemmten Kontrollen abzüglich der Menge in den gehemmten Ansätzen.

⁴ Diese Daten werden auch in Abbildung 3-12 gezeigt.

⁵ Bezogen auf die äquivalente Menge CH₄, die aus allen sich ansammelnden Metaboliten gebildet werden könnte.

3.2.3.2 Massenbilanzierung

Die Mengen der Intermediate, die sich nach Zugabe von BES ansammelten, wurden gemäß der Stöchiometrie ihres vollständigen Abbaus zu CH_4 in Äquivalente CH_4 umgerechnet (Tabelle 2-4). Diese äquivalenten Mengen wurden verglichen mit den Mengen CH_4 , die in den Kontrollen ohne Hemmstoff gebildet wurden. Abbildung 3-12 zeigt das Verhältnis der Äquivalente CH_4 zu den CH_4 -Mengen in den Kontrollen in Ansätzen mit Stielstroh im Laufe der Inkubation, wobei das Muster aber in allen Ansätzen gleich war. Schon nach wenigen Tagen blieb das Verhältnis konstant. In Tabelle 3-6 sind die Konzentrationen der Intermediate in den verschiedenen Ansätzen und die prozentualen Anteile der äquivalenten Methanmengen am tatsächlich gebildeten Methan (in den Kontrollen ohne Hemmstoff) für Tag 21 nach Zugabe des Hemmstoffes zusammengefasst.

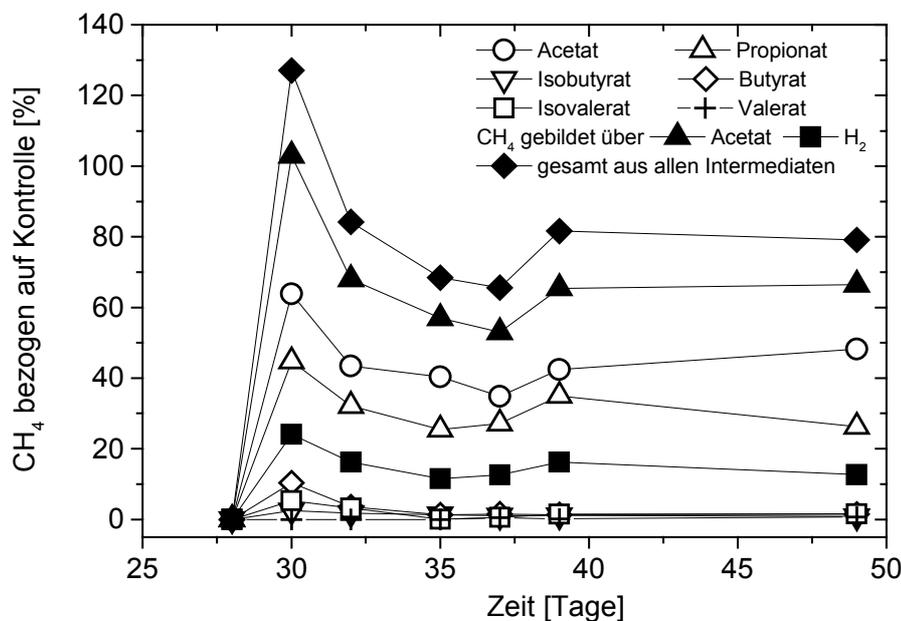


Abbildung 3-12: Intermediate, die sich bei der Inkubation von Stroh vom Stiel der Reispflanze nach der Zugabe von BES ansammelten, umgerechnet in äquivalente Mengen, CH_4 und bezogen auf die Menge CH_4 in den ungehemmten Kontrollen. Die äquivalenten Mengen CH_4 wurden berechnet gemäß des vollständigen Abbaus der Intermediate zu CH_4 über Acetat und H_2 . Angaben beziehen sich auf 40 g Reisfeldboden und 0,5 g Reisstroh pro Ansatz.

Laut der Massenbilanzierung wurden 48,2 bis 56,5 % (mit Stroh) bzw. 83,5 % (ohne Stroh) des CH_4 aus Acetat gebildet, 18,2 bis 27,7 % aus Propionat. Die anderen Intermediate trugen nur geringfügig zur Methanbildung bei (Tabelle 3-6). Acetat und Propionat sind demnach die wichtigsten Intermediate des methanogenen Abbaus.

Ungefähr 80 bis 110 % des Methans, das in den Kontrollen ohne Hemmung gefunden wurde, konnte aus den angehäuften Intermediaten gebildet werden. Über Acetat wurden laut der Stöchiometrie der Abbauprozesse 84 bis 89 % des aus allen Intermediaten berechneten Methans gebildet, wobei es keinen Unterschied machte, ob Stroh zugesetzt wurde und welche Strohfraction gegebenenfalls zugegeben wurde.

3.2.3.3 Thermodynamische Berechnungen

Auch für die thermodynamischen Berechnungen werden die Ergebnisse für Ansätze mit Stroh vom Stiel als Beispiel dargestellt, da die Ergebnisse für alle Ansätze das gleiche zeigten. Aus den Konzentrationen bzw. Partialdrücken von Intermediaten, H_2 , CO_2 und CH_4 wurden die freien Reaktionsenthalpien (ΔG) verschiedener Reaktionen in Ansätzen mit und ohne Zugabe von BES berechnet.

Die Methanogenese war eindeutig exergonisch mit ΔG -Werten von -23 bis -26 kJ mol^{-1} CH_4 für die Bildung aus H_2/CO_2 und -18 bis -26 kJ mol^{-1} für die Bildung aus Acetat (Tabelle 3-7). Die homoacetogene Bildung von Acetat aus H_2/CO_2 war in den ungehemmten Kontrollen nur leicht exergonisch (-6 bis 0 kJ mol^{-1} Acetat), wurde aber nach der Hemmung der Methanogenese mit BES exergonischer (-18 bis -23 kJ mol^{-1} Acetat) (Tabelle 3-7). Der syntrophe Abbau von Propionat zu Acetat, H_2 und CO_2 , der in den Kontrollen exergonisch war (-15 bis -26 kJ mol^{-1} Propionat), wurde durch die Zugabe von BES endergonisch ($+4$ bis $+16 \text{ kJ mol}^{-1}$ Propionat) (Tabelle 3-7). Das gleiche galt für den syntrophen Abbau von Butyrat, Isobutytrat, Valerat und Isovalerat (Tabelle 3-7).

Tabelle 3-7: Freie Reaktionsenthalpie (ΔG), die für verschiedene H_2 -produzierende Reaktionen, für die Methanogenese und für die Homoacetogenese zur Verfügung standen bei Inkubation von Reisstroh vom Stiel in Reisfeldboden mit und ohne Hemmung der Methanogenese mit BES

Zeit [Tage]	ΔG [kJ/Reaktion] zum angegebenen Zeitpunkt				
	28	30	32	37	49
<u>H₂ Produktion</u>					
Propionat + 2 H ₂ O → Acetat + CO ₂ + 3 H ₂					
Kontrolle	-24,5	-25,5	-24,1	-17,4	-15,0
nach Hemmung	-24,9	3,9	7,1	8,2	16,1
Isobutyrat + 2 H ₂ O → 2 Acetat + H ⁺ + 2 H ₂					
Kontrolle	-20,1*	-28,1*	-26,7*	-19,1*	-26,6*
nach Hemmung	-27,4*	5,2	7,7	9,4	17,3
Butyrat + 2 H ₂ O → 2 Acetat + H ⁺ + 2 H ₂					
Kontrolle	-22,1*	-30,0*	-28,7*	-21,1*	-28,6*
nach Hemmung	-26,2	-0,3	4,0	6,5	13,9
Isovalerat + CO ₂ + 2 H ₂ O → 3 Acetat + H ₂ + 2H ⁺					
Kontrolle	-41,0	-48,6*	-46,8*	-41,4	-46,5*
nach Hemmung	-38,5	-11,2	-7,3	-4,1	4,6
Valerat + 2 H ₂ O → Acetat + Propionat + H ⁺ + 2 H ₂					
Kontrolle	-11,6*	-17,1*	-16,7*	-15,1*	-26,5*
nach Hemmung	-10,8*	7,6*	10,3*	8,9	13,6
<u>Methanogenese</u>					
CO ₂ + 4 H ₂ → 2 H ₂ O + CH ₄					
Kontrolle	-25,2	-26,0	-26,1	-26,0	-22,8
Acetat + H ⁺ → CH ₄ + CO ₂					
Kontrolle	-25,5	-19,8	-19,9	-22,2	-17,6
<u>Homoacetogenese</u>					
4 H ₂ + 2 CO ₂ → Acetat + 2 H ₂ O + H ⁺					
Kontrolle	0,4	-6,2	-6,2	-3,7	-5,2
nach Hemmung	2,6	-19,8	-20,3	-17,5	-23,2

Die ΔG -Werte wurden berechnet aus den Konzentrationen, die in den Abbildung 3-10 und 3-11 dargestellt sind, aus den ΔG^0 -Werten in Tabelle 2-5. und aus den pH-Werten in den Ansätzen (siehe Kapitel 3.2.3.1). Lag eine Konzentration unter dem Detektionslimit wurde eine Konzentration von 10 μM eingesetzt, um die Reaktionsenthalpien berechnen zu können, die für die Reaktionen zur Verfügung standen, wenn die entsprechenden Intermediate in geringen Konzentrationen vorlägen. (Werte markiert mit *).

3.2.4 Weitere Substanzen, die während des Abbaus gefunden wurden

Bei der HPLC Analyse der Porenwasserproben aus Ansätzen mit allen Strohfraktionen zeigten sich im UV-Detektor (205 nm) verschiedene Peaks, die bislang keinen Substanzen zugeordnet werden konnten. Die Flächen dieser Peaks nahmen, wie es bei Intermediaten des methanogenen Abbaus zu beobachten war (siehe Kapitel 3.2.1 und 3.2.3), im Laufe der Inkubation vorübergehend zu und stiegen nach der Zugabe von BES im Vergleich zu ungehemmten Kontrollen an. In Abbildung 3-13 ist die Fläche eines dieser Peaks als Beispiel dargestellt (Daten anderer Peaks werden nicht gezeigt). In Proben aus Ansätzen ohne Stroh wurden diese Peaks nicht detektiert. Die Flächen von neun Peaks stiegen über 1000 relative Flächeneinheiten und zeigten den für die bekannten Intermediate typischen Verlauf.

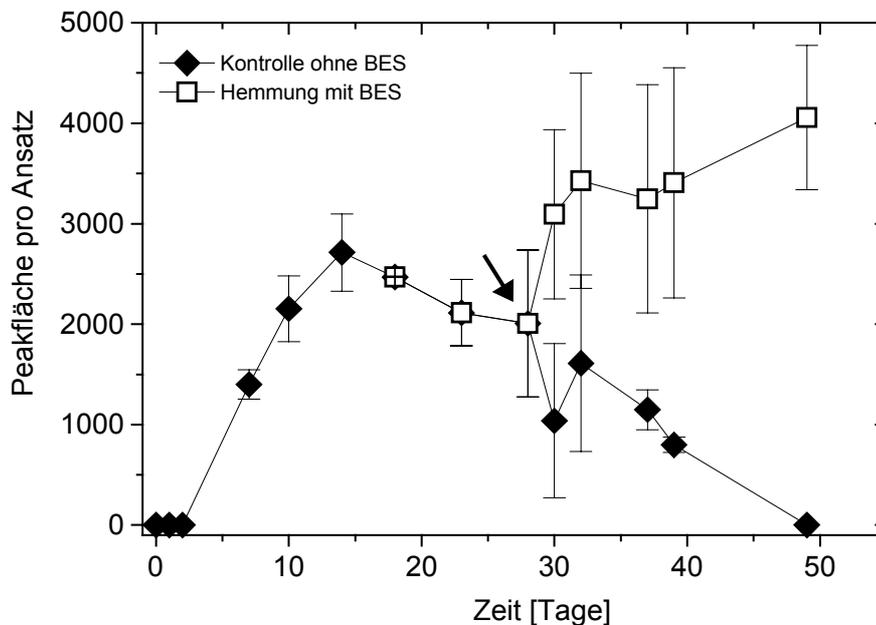


Abbildung 3-13: Änderung der Peakfläche einer unbekannt Substanz (Retentionszeit 53 min bei 205 nm im UV-Detektor der HPLC) bei Inkubation von Reisstroh vom Stiel im Reisfeldboden mit und ohne Hemmung mit BES (Pfeil zeigt Zeitpunkt der Zugabe) nach 28 Tagen. Angaben beziehen sich auf 40 g Reisfeldboden und 0,5 g Reisstroh pro Ansatz. (n = 3, Mittelwert \pm Standardabweichung)

3.3 Hydrolyse der Polysaccharide

Die Zersetzung des Reisstrohs war optisch erkennbar und konnte anhand des Verlustes von Trockengewicht verfolgt werden. Außerdem konnte sie über die Hydrolyse der Polysaccharide, über die Aktivität der vorhandenen hydrolytischen Enzyme oder über die Freisetzung von Zuckermonomeren charakterisiert werden.

3.3.1 Zersetzung des Reisstrohs

Die Abbau des Reisstrohs unter anaeroben Bedingungen war bereits rein optisch durch den Zerfall in einzelne Fasern erkennbar (Abbildung 3-14). Unter dem Mikroskop konnte man sehen, dass sich im Porenwasser der Bodenaufschlämmungen kleine abgespaltene Stücke von Stroh befanden.

In den ersten 30 Tagen der Inkubation von Reisstroh in Reisfeldboden nahm das Trockengewicht des Strohs um ungefähr 50 % ab (Abbildung 3-15). Danach verlief der Gewichtsverlust deutlich langsamer. Innerhalb der folgenden 110 Tagen verringerte sich das Gewicht nur noch um 0,1 g (ungefähr 20 % des Ausgangsgewichtes von 0,5 g).

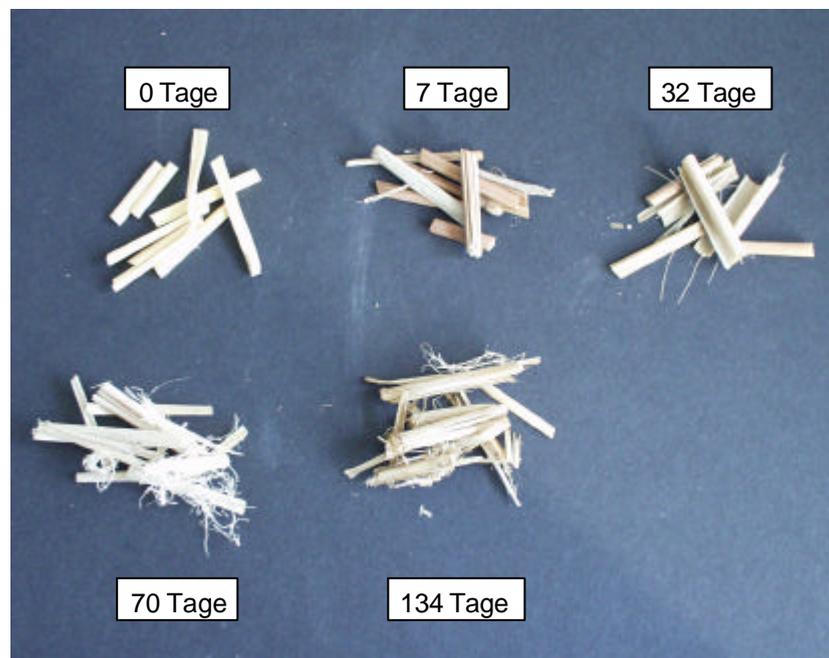


Abbildung 3-14: Optisch erkennbare Zersetzung von Reisstroh nach unterschiedlich langer Inkubation unter anaeroben Bedingungen in Reisfeldboden

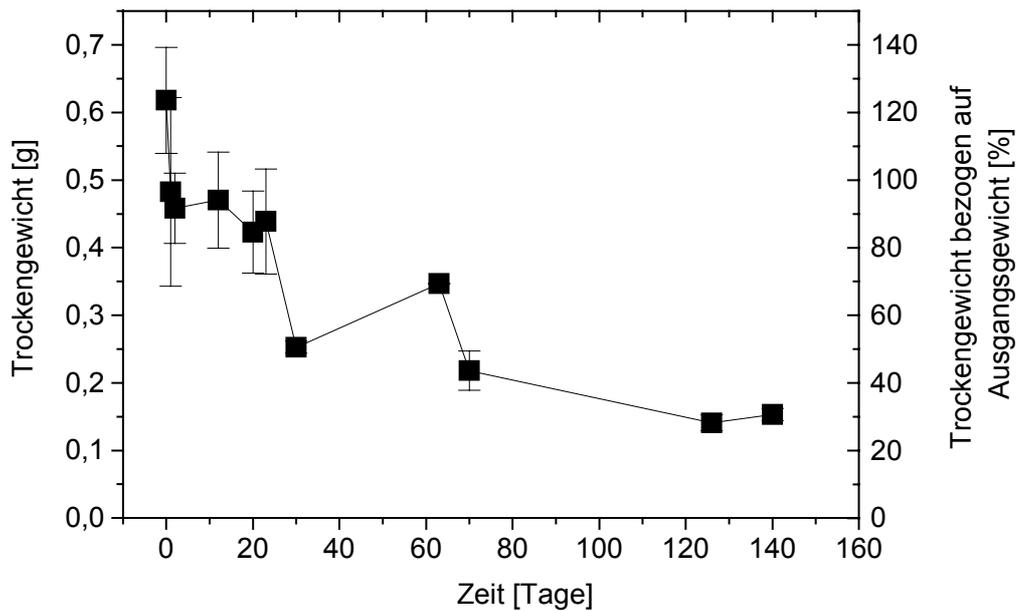


Abbildung 3-15: Trockengewicht von Reisstroh vom Stiel bei der Inkubation in Reisfeldboden und prozentualer Anteil des Trockengewichtes am Ausgangsgewicht von 0,5 g Stroh. (n = 3, Mittelwert \pm Standardabweichung)

3.3.2 Potentielle Aktivität hydrolytischer Enzyme

Die Aktivität der hydrolytischen Enzyme wurde mit Tests, in denen künstliche MUF-Substrate eingesetzt wurden, bestimmt. Die Freisetzung von MUF (Methylumbelliferon) war dabei das Maß für die Enzymaktivität. Gemessen wurde die Aktivität der Glucosidase, der Xylosidase und der Exoglucanase. In diesen Versuchen wurde nur Reisstroh vom Stiel eingesetzt.

Durch die Zugabe von Reisstroh stieg die Aktivität aller drei Enzyme deutlich an (Abbildung 3-16). Im Reisfeldboden ohne Stroh wurden nahezu konstante Werte von ungefähr $180 \text{ nmol MUF h}^{-1}$ pro Ansatz (Xylosidase), ungefähr $170 \text{ nmol MUF h}^{-1}$ pro Ansatz (Glucosidase) bzw. $17 \text{ nmol MUF h}^{-1}$ pro Ansatz (Exoglucanase) (Abbildung 3-16 B). Durch die Zugabe von Reisstroh stieg die Aktivität der Glucosidase innerhalb eines Tages auf ungefähr $600 \text{ nmol MUF h}^{-1}$ pro Ansatz, sank dann aber wieder ab, bis sie nach 7 Tagen einen konstanten Wert (ungefähr $370 \text{ nmol MUF h}^{-1}$ pro Ansatz) erreichte, der sich auch nach 115 Tagen nicht änderte (Abbildung 3-16 A). Die Aktivitäten der Xylosidase und der Exoglucanase stiegen dagegen während der ersten 11 Tage nach der Zugabe von Reisstroh stetig an. Danach blieben die

Aktivitäten zunächst konstant (Xylosidase: ungefähr 500 nmol MUF h⁻¹ pro Ansatz, Exoglucanase: ungefähr 60 nmol MUF h⁻¹ pro Ansatz), gingen nach 115 Tagen aber wieder leicht zurück (Abbildung 3-16 A).

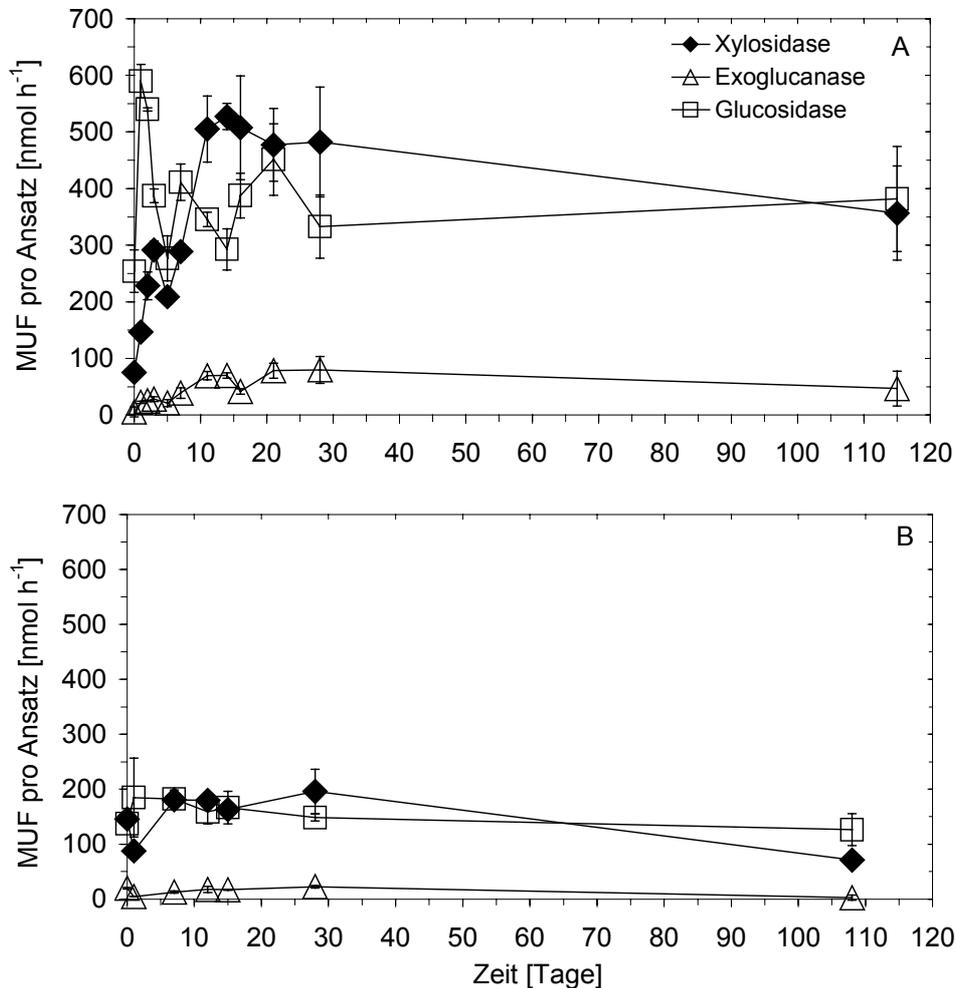


Abbildung 3-16: Aktivität der Glucosidase, Exoglucanase und Xylosidase im Laufe der Inkubation von Reisfeldboden (A) mit Stroh und (B) ohne Stroh bestimmt mit den entsprechenden MUF-Substraten. Angaben beziehen sich auf 1,5 g Reisfeldboden und 0,02 g Reisstroh vom Stiel pro Ansatz. (n = 3, Mittelwert ± Standardabweichung)

3.3.3 Freisetzung von Zuckern

Zur Bestimmung der Freisetzung von Zuckern wurde den Ansätzen Toluol zugegeben, so dass die Aufnahme der Zucker in die Zellen gehemmt wurde und die sich anhäufenden Zucker im Porenwasser gemessen werden konnten. In Abbildung 3-17 ist die Freisetzung von Zuckern nur für Ansätze mit Stroh vom Stiel und ohne Stroh

dargestellt. In den Ansätzen mit Stroh von der Blattspreite oder -scheide waren die Aktivitäten geringer, aber genauso verteilt (Daten werden nicht gezeigt).

Zu Beginn der Inkubation war die Freisetzung der Zucker am größten, mit Raten von $9,6 \mu\text{mol h}^{-1}$ pro Ansatz (Stiel, Abbildung 3-17), $1,7 \mu\text{mol h}^{-1}$ pro Ansatz (Blattscheide), $1,5 \mu\text{mol h}^{-1}$ pro Ansatz (Blattspreite) und $1,0 \mu\text{mol h}^{-1}$ pro Ansatz (ohne Stroh). Innerhalb der ersten 11 Tage sanken die Aktivitäten auf $0,17$ bis $0,3 \mu\text{mol h}^{-1}$ pro Ansatz in Ansätzen mit Stroh und $0,10 \mu\text{mol h}^{-1}$ pro Ansatz in Ansätzen ohne Stroh. In den Ansätzen mit Stroh vom Stiel nahm die Aktivität nach 120 Tagen nochmals geringfügig ab (Abbildung 3-17).

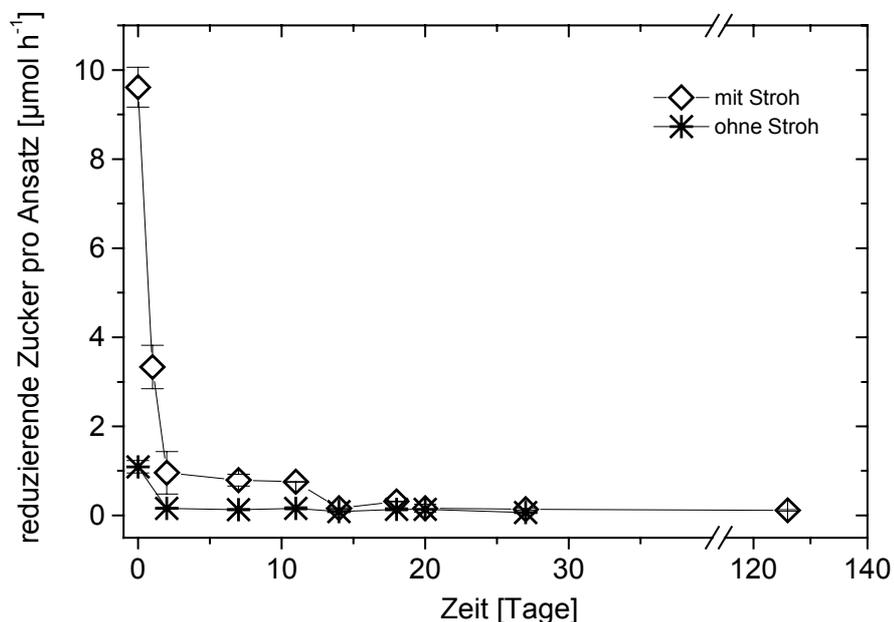


Abbildung 3-17: Einfluss von Reisstroh auf die Freisetzung reduzierender Zucker nach Hemmung der Zuckeraufnahme in die Zellen durch Toluol im Vergleich zu Reisfeldboden ohne Stroh. Angaben beziehen sich auf 20 g Reisfeldboden und 0,25 g Reisstroh pro Ansatz. (n = 3, Mittelwert \pm Standardabweichung)

Die Konzentration der reduzierenden Zucker wurde in Ansätzen mit Stielstroh außerdem ohne den Zusatz von Toluol gemessen. Innerhalb von 8 Stunden stieg die Konzentration der Zucker auf ungefähr $220 \mu\text{mol}$ pro Ansatz an (Abbildung 3-18), nahm dann aber wieder ab. Nach 48 Stunden war eine Schwellenkonzentration von ungefähr $6 \mu\text{mol}$ pro Ansatz erreicht, die über 126 Tage unverändert blieb.

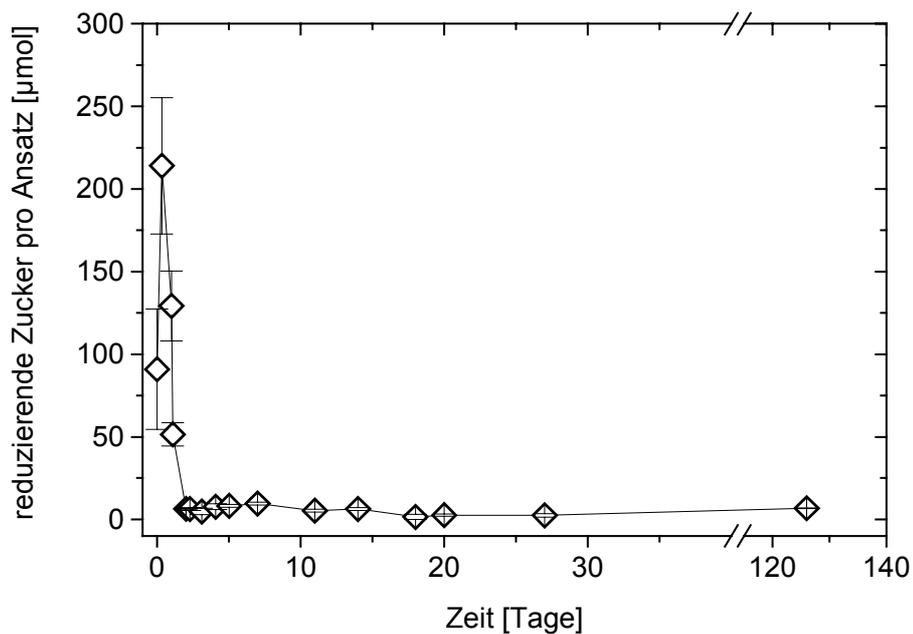


Abbildung 3-18: Konzentration reduzierender Zucker während der Inkubation von Reisstroh vom Stiel in Reisfeldboden. Angaben beziehen sich auf 20 g Reisfeldboden und 0,25 g Reisstroh vom Stiel pro Ansatz. (n = 3, Mittelwert ± Standardabweichung)

3.4 Trennung der Kompartimente Stroh und Boden

Eine Trennung der Ansätze in die beiden Kompartimente Reisstroh und Reisfeldboden sollte zeigen, wo die einzelnen Abbauprozesse lokalisiert waren. Nach der Trennung wurde der Boden ohne Stroh weiterinkubiert (Bodenansatz, Tabelle 2-3), und das Stroh wurde ohne Boden in Puffer (Strohansatz, Tabelle 2-3) inkubiert. In Kontrollen wurden Boden und Stroh weiterhin zusammen inkubiert (Kontrolle, Tabelle 2-3). In den getrennten Ansätzen und den Kontrollen wurde die Bildung von CH_4 , H_2 und den Intermediaten des methanogenen Abbaus verfolgt und die Aktivität hydrolytischer Enzyme und die Freisetzung reduzierender Zucker gemessen. Alle hier dargestellten Ergebnisse stammen von Versuchen, in denen Stroh vom Stiel der Reispflanze eingesetzt wurde.

3.4.1 Produktion von CH₄, H₂ und Intermediaten des anaeroben Abbaus

3.4.1.1 Konzentration von CH₄, H₂ und Intermediaten

Für die Untersuchung der Produktion von CH₄, H₂ und Intermediaten an Reisstroh und in Reisfeldboden wurden die Kompartimente nach 7, 28 und 97 Tagen gemeinsamer Inkubation getrennt. Zusätzlich wurde Stroh von Anfang an ohne Boden in Puffer inkubiert.

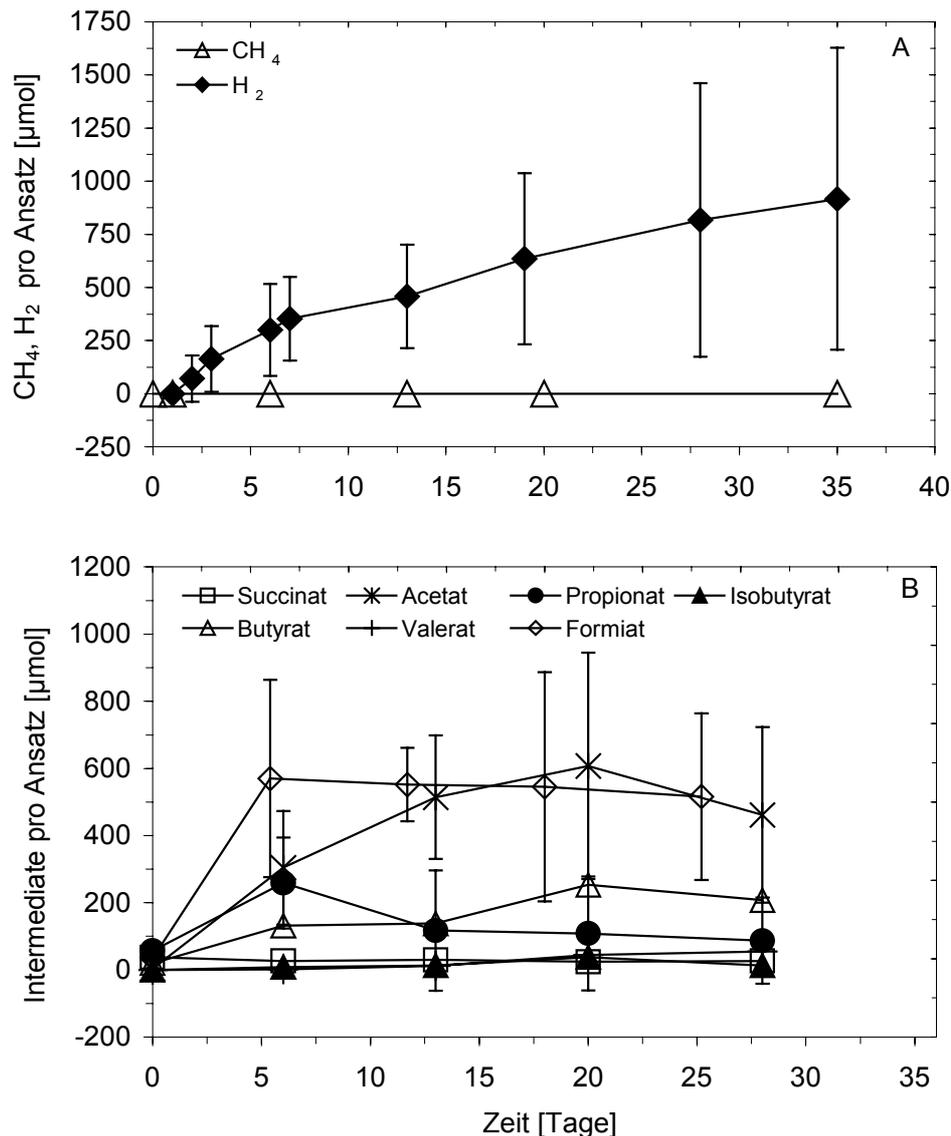


Abbildung 3-19: Konzentration von (A) H₂ und CH₄ und (B) Intermediaten bei der Inkubation von Reisstroh vom Stiel in Puffer ohne vorherige Inkubation in Reisfeldboden. Angaben beziehen sich auf 0,5 g Reisstroh in 50 ml Kaliumphosphat/NaHCO₃-Puffer pro Ansatz. (n = 3, Mittelwert ± Standardabweichung)

In Ansätzen, in denen Stroh von Anfang an ohne Boden in Puffer inkubiert wurde, konnte kein CH_4 nachgewiesen werden (Abbildung 3-19 A). H_2 und Intermediate des Strohabbaus sammelten sich dagegen in Ansätzen mit 0,5 g Stroh in 50 ml Puffer bis zu Konzentrationen von ungefähr 900 μmol H_2 , 600 μmol Acetat, 460 μmol Formiat, 340 μmol Butyrat oder 120 μmol Propionat an (Abbildung 3-19).

Wurden Stroh und Boden nach 7 Tagen gemeinsamer Inkubation getrennt, stieg die Methankonzentration in den Bodenansätzen (183 $\mu\text{mol d}^{-1}$ pro Ansatz mit 40 g Boden) wie in den Kontrollen (244 $\mu\text{mol d}^{-1}$ pro Ansatz mit 40 g Boden und 0,5 g Stroh) zunächst stark an (Abbildung 3-20 A). Nach 16 Tagen war die Methanbildung in beiden Ansätzen konstant. Die Methanbildung im Boden war mit 2,5 $\mu\text{mol d}^{-1}$ pro Ansatz nur noch gering gegenüber der CH_4 -Bildung in der Kontrolle mit 55 $\mu\text{mol d}^{-1}$ pro Ansatz. Erst nach 16 Tagen war mit 6,2 $\mu\text{mol d}^{-1}$ pro Ansatz (mit 0,5 g Stroh in 50 ml Puffer) eine geringe Methanbildung im Strohanatz messbar (Abbildung 3-20 A). Die Konzentration von H_2 stieg in allen Ansätzen zunächst leicht an, sank dann aber wieder und erreichte nach 16 Tagen eine Schwellenkonzentration von ungefähr 25 ppm_v (Abbildung 3-20 B).

Die Konzentrationen der Intermediate in Boden- und Kontrollansätzen waren direkt nach der Trennung gleich (Abbildung 3-20 C-F). Neben Acetat, Propionat, Butyrat und Isobutyrat (Abbildung 3-20 C-F) wurden auch Isovalerat, Valerat und Caproat gefunden (Daten werden nicht gezeigt). Die Konzentrationen in den Kontrollansätzen erreichten, mit Ausnahme von Propionat, Schwellenkonzentrationen wenig über dem Detektionslimit von 10 μM zu dem Zeitpunkt, an dem die Methanogenese ebenfalls konstant wurde (vergleiche Kapitel 3.2.1). Die Konzentration der Fettsäuren sank in den Bodenansätzen viel schneller (Abbildung 3-20 C-F). Zu dem Zeitpunkt, an dem die Methanbildung nur noch gering war, konnte Acetat nicht mehr nachgewiesen werden (Abbildung 3-20 C). Die anderen Fettsäuren, mit Ausnahme von Propionat (Abbildung 3-20 D), waren nur noch in geringen Konzentrationen vorhanden. Kurz darauf waren auch sie nicht mehr nachweisbar. In den Strohanätzen sammelten sich dagegen die Intermediate an, hauptsächlich Acetat (21 $\mu\text{mol d}^{-1}$ pro Ansatz) und Propionat (1,3 $\mu\text{mol d}^{-1}$ pro Ansatz).

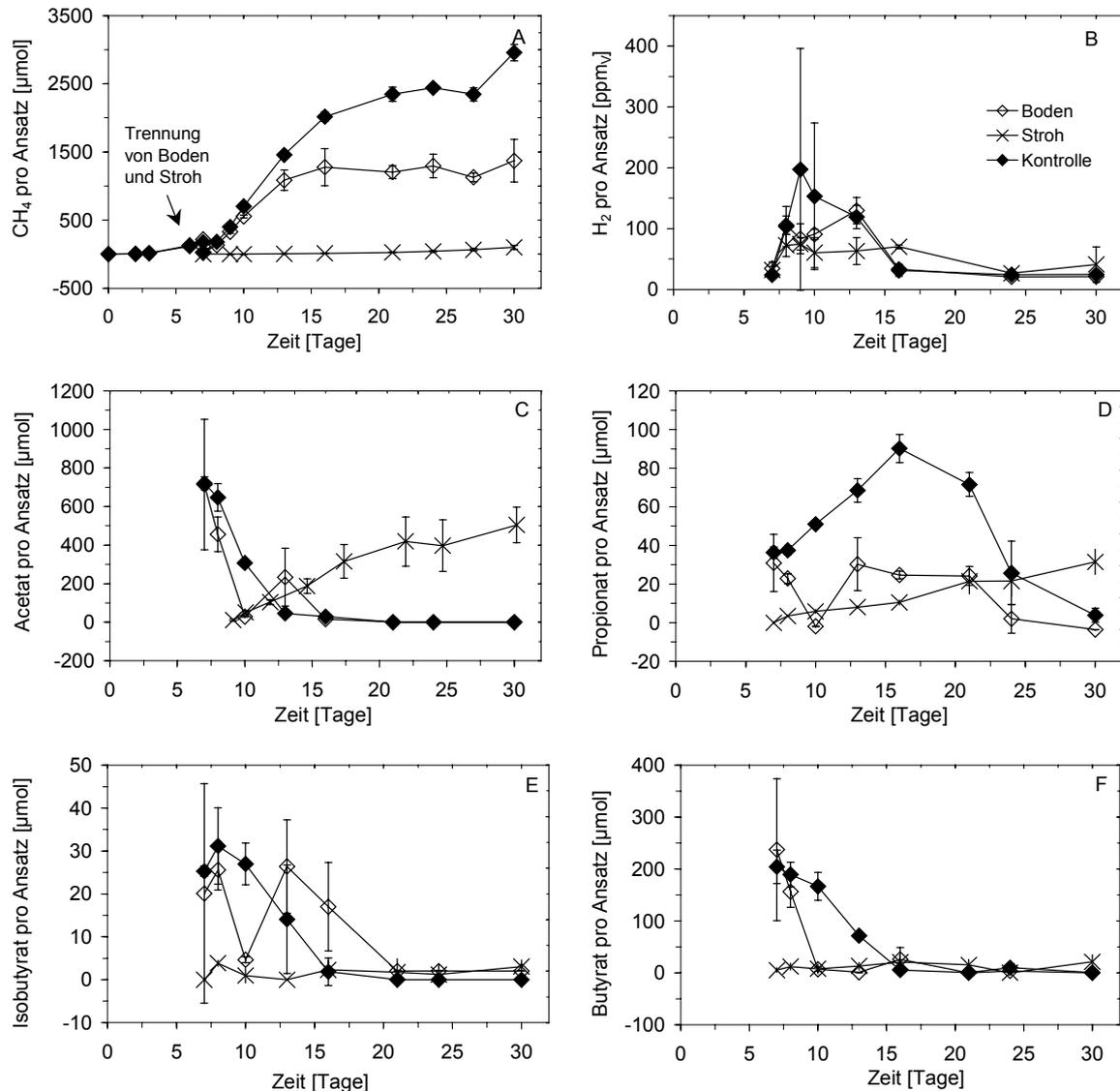


Abbildung 3-20: Konzentration von (A) CH₄, (B) H₂ und (C-F) verschiedenen Intermediaten in Ansätzen, in denen Boden und Stroh getrennt inkubiert wurden, bei der Trennung der Kompartimente nach 7 Tagen gemeinsamer Inkubation, und in nicht getrennten Kontrollen. Angaben beziehen sich auf 40 g Reisfeldboden und 0,5 g Reisstroh pro Ansatz. (n = 3, Mittelwert ± Standardabweichung)

Nach der Trennung von Boden und Stroh nach 28 Tagen wurde CH₄ in allen Ansätzen mit konstanten Raten gebildet (Abbildung 3-21 A). In der Kontrolle war die CH₄-Produktion mit 45 µmol d⁻¹ pro Ansatz (mit 40 g Boden und 0,5 g Stroh) deutlich höher als in den Ansätzen mit Boden (9 µmol d⁻¹ pro Ansatz mit 40 g Boden) oder Stroh (2 µmol d⁻¹ pro Ansatz mit 0,5 g Stroh). Die Konzentration von H₂ stieg in allen Ansätzen zunächst an, sank dann aber bis auf eine Schwellenkonzentration von 15 bis 20 ppm_v ab (Abbildung 3-21 B). Anders als nach der Trennung nach 7 Tagen wurden Fettsäuren nicht nur in der Kontrolle, sondern auch in den Bodenansätzen in geringen,

konstanten Konzentrationen geringfügig über der Nachweisgrenze von 10 μmol gefunden (Abbildung 3-21 C-F). In den Strohansätzen sammelten sich die Intermediate auch hier an (Abbildung 3-21 C-F). Es handelte sich dabei wiederum hauptsächlich um Acetat (9 $\mu\text{mol d}^{-1}$ pro Ansatz) und Propionat (7 $\mu\text{mol d}^{-1}$ pro Ansatz).

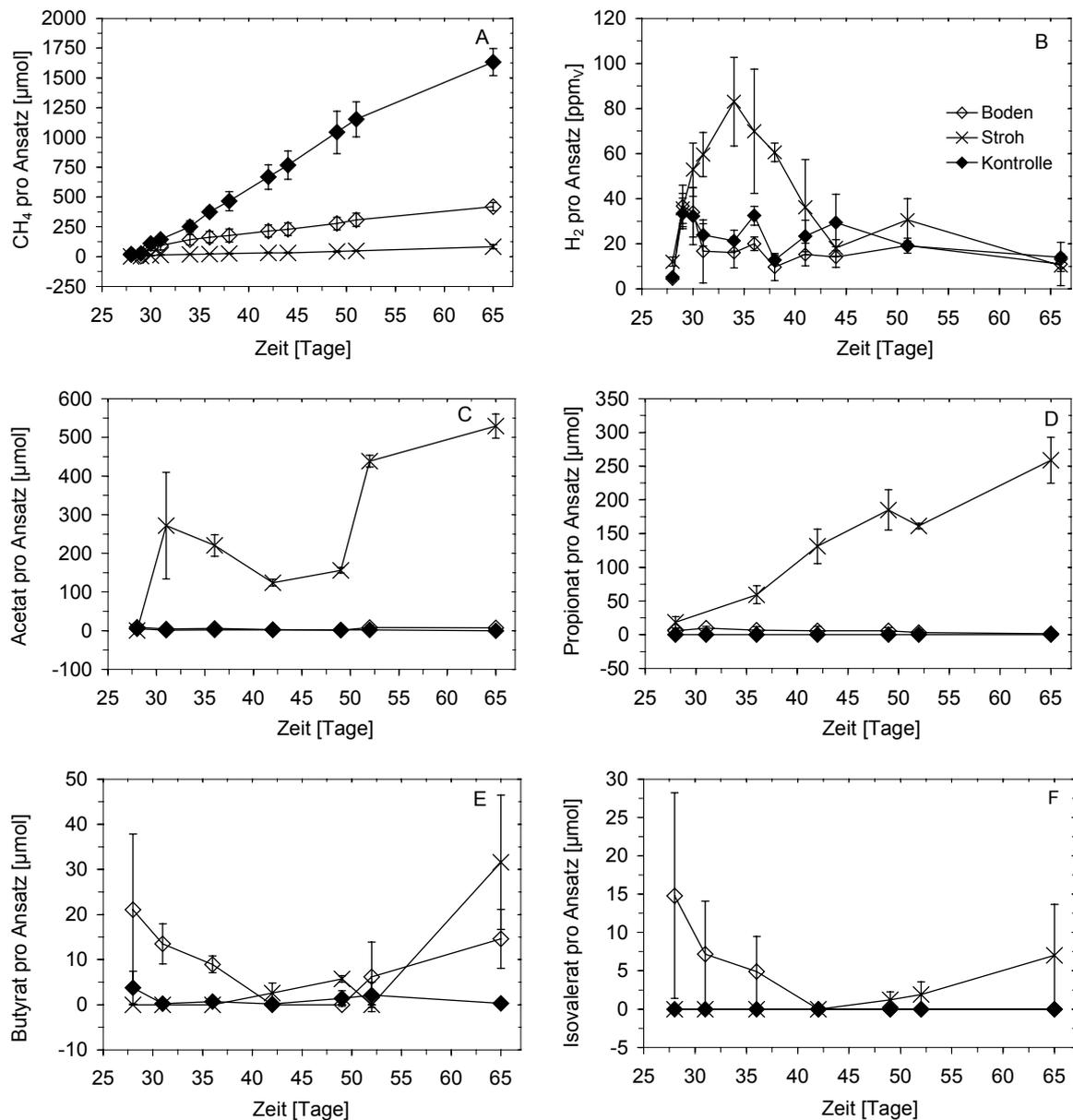


Abbildung 3-21: Konzentration von (A) CH_4 , (B) H_2 und (C-F) verschiedenen Intermediaten in Ansätzen, in denen Boden und Stroh getrennt inkubiert wurden, bei der Trennung der Kompartimente nach 28 Tagen gemeinsamer Inkubation, und in nicht getrennten Kontrollen. Angaben beziehen sich auf 40 g Reisfeldboden und 0,5 g Reisstroh vom Stiel pro Ansatz. ($n = 3$, Mittelwert \pm Standardabweichung)

Die Trennung der Kompartimente nach 97 Tagen führte zu ähnlichen Ergebnissen wie die Trennung nach 28 Tagen. Die CH_4 -Konzentrationen stiegen gleichmäßig in allen

Ansätzen an, jedoch mit geringeren Raten (Kontrolle: $25 \mu\text{mol d}^{-1}$ pro Ansatz, Bodenansatz: $5 \mu\text{mol d}^{-1}$ pro Ansatz, Strohansatz: $5 \mu\text{mol d}^{-1}$ pro Ansatz) (Abbildung 3-22 A). Die H_2 -Konzentration stieg in den Strohanansätzen stärker an, als in den anderen Ansätzen und erreicht mit 100 ppm_V eine deutlich höhere Konzentration als in den Boden- und Kontrollansätzen (ungefähr 15 ppm_V) (Abbildung 3-22 B). Die Konzentrationen der Intermediate blieben in den Boden- und Kontrollansätzen auch hier auf einem Schwellenwert (Abbildung 3-22 C-F). Eine Anhäufung in den Strohanansätzen konnte nur noch bei Acetat und Propionat (3 bzw. $0,8 \mu\text{mol d}^{-1}$ pro Ansatz) festgestellt werden (Abbildung 3-22 C-F).

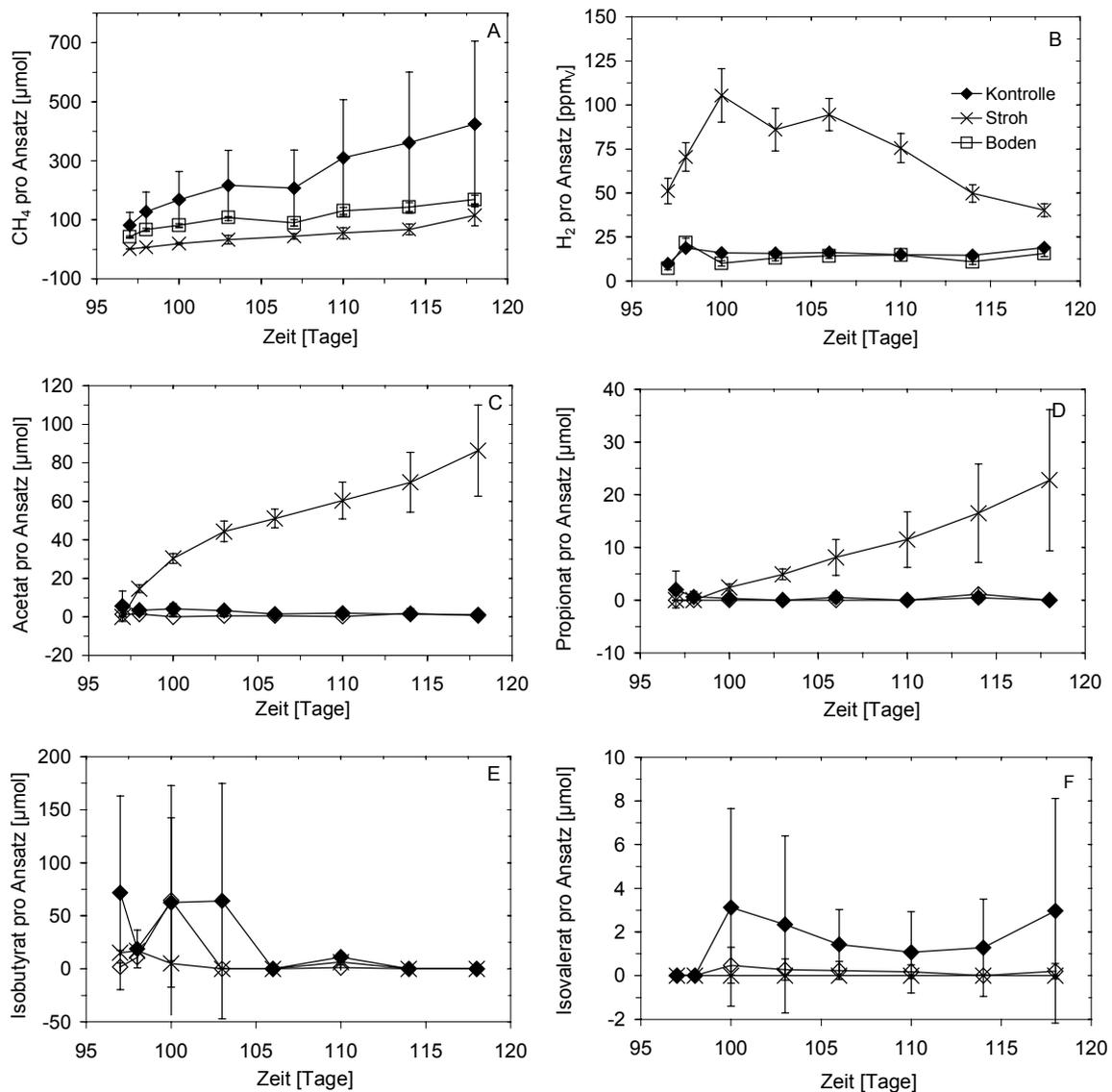


Abbildung 3-22: Konzentration von (A) CH_4 , (B) H_2 und (C-F) verschiedenen Intermediaten in Ansätzen, in denen Boden und Stroh getrennt inkubiert wurden, bei der Trennung der Kompartimente nach 97 Tagen gemeinsamer Inkubation, und in nicht getrennten Kontrollen. Angaben beziehen sich auf 40 g Reisfeldboden und $0,5 \text{ g}$ Reisstroh vom Stiel pro Ansatz. ($n = 3$, Mittelwert \pm Standardabweichung)

Um sicher gehen zu können, dass die Methanproduktion in den Strohansätzen nicht dadurch eingeschränkt war, dass die methanogenen *Archaea* beim Waschen des Strohs abgelöst wurden, wurde der Puffer, der zum Waschen des Strohs benutzt wurde, anaerob in Serumflaschen inkubiert. In den Ansätzen wurden Acetat und H_2 aus den Strohresten im Puffer gebildet (Abbildung 3-23). Obwohl die Konzentrationen für die Methanogenese ausgereicht hätten, wurde kaum CH_4 gebildet (Abbildung 3-23). Warum die Konzentration des H_2 in den Ansätzen mit der Zeit wieder abnahm, wurde nicht weiter untersucht.

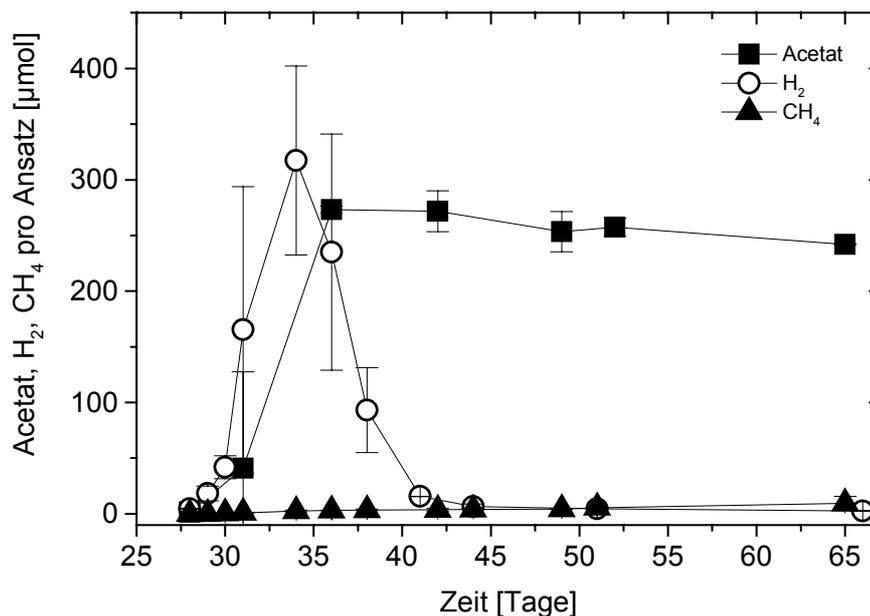


Abbildung 3-23: Konzentrationen von H_2 , CH_4 und Acetat in Ansätzen mit je 40 ml des Puffers, der zum Waschen des Strohs bei der Trennung von Stroh und Boden benutzt wurde. (n = 3, Mittelwert \pm Standardabweichung)

3.4.1.2 Vergleich verschiedener Methanquellen

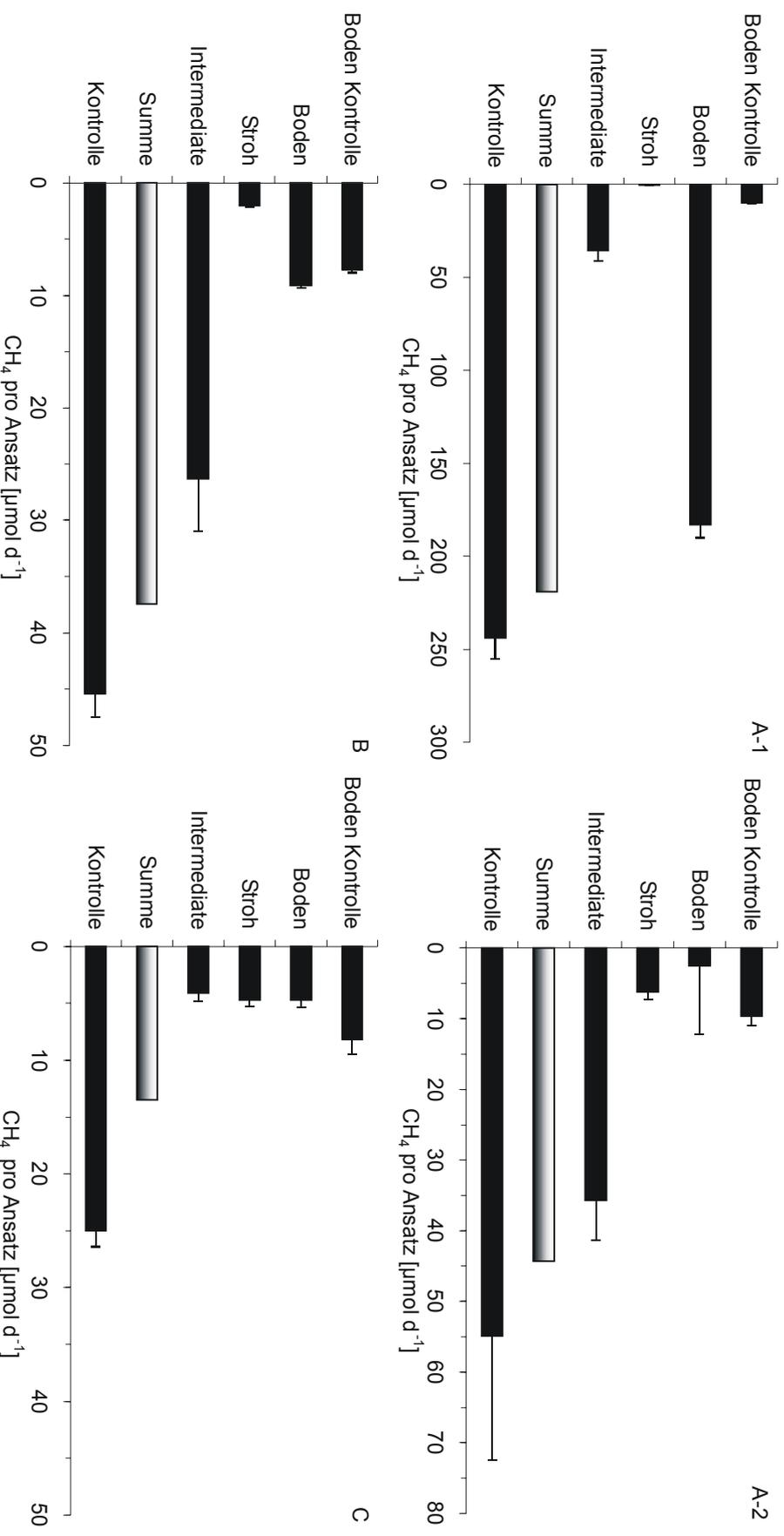
In den Boden- und Strohansätzen wurde CH_4 gebildet und in den Strohansätzen sammelten sich Intermediate an, die zu CH_4 umgesetzt werden könnten (Abbildung 3-20 bis 3-22). Durch eine Massenbilanzierung (siehe Kapitel 2.10.3) konnten die Mengen der Intermediate in äquivalente Mengen CH_4 umgerechnet werden. Um einen Vergleich zwischen diesen verschiedenen Methanquellen ziehen zu können, wurden die entsprechenden Produktionsraten berechnet. In den Vergleich einbezogen wurden außerdem die Summe der drei oben genannten CH_4 -Mengen (das CH_4 in Boden oder Strohansätzen und das aus den Intermediaten gebildete CH_4) und das Gesamtmethan in Kontrollen, in denen Stroh und Boden gemeinsam (Abbildung 3-20 bis 3-22) oder

Boden ohne Stroh (Abbildung 3-6, Kapitel 3.2.1) inkubiert wurde. Da die Methanproduktion nach einer Trennung nach 7 Tagen in zwei verschiedenen Phasen verlief, einer logarithmischen und einer linearen (Abbildung 3-20), wurden auch die Produktionsraten dieser zwei Phasen getrennt voneinander verglichen.

Nach der Trennung nach 7 und 28 Tagen konnten 80 bis 90 % des Methans, das in den Kontrollen gebildet wurde, in den getrennten Ansätzen wiedergefunden werden, bei der Trennung nach 97 Tagen waren es 54 % (Abbildung 3-24).

In der logarithmischen Phase der Methanbildung nach der Trennung nach 7 Tagen trug die Methanbildung in den Bodenansätzen 84 % zur Gesamtmethanbildung bei, während sie in der darauf folgenden linearen Phase und nach der Trennung nach 28 Tagen mit 6 bzw. 24 % einen deutlich geringeren Anteil stellte (Abbildung 3-24). Mit Ausnahme der logarithmischen Phase lag die Methanproduktion in den Bodenansätzen im gleichen Bereich ($< 10 \mu\text{mol d}^{-1}$ pro Ansatz) wie die Methanproduktion in den Ansätzen, in denen Boden von Anfang an ohne Stroh inkubiert wurde.

In den Strohansätzen wurde mit $0,5$ bis $6,2 \mu\text{mol d}^{-1}$ pro Ansatz zu allen Zeitpunkten wenig CH_4 gebildet (Abbildung 3-24). Aus den Intermediaten, die sich in den Ansätzen ansammelten, stammten dagegen bis zu 70 bis 80 % des Gesamtmethans (lineare Phase bei Trennung nach 7 Tagen und Trennung nach 28 Tagen) (Abbildung 3-24). Bei der Trennung nach 97 Tagen sank die CH_4 -Bildung aus den Intermediaten von 26 auf $4 \mu\text{mol d}^{-1}$ pro Ansatz, wodurch die Gesamtmenge des CH_4 ebenfalls sank und die verschiedenen Methanquellen gleich stark an der Gesamtproduktion des CH_4 beteiligt waren.

**Abbildung 3-24:**

Produktionsraten von CH_4 - in Ansätzen mit Stroh (Stroh) und Boden (Boden) nach der Trennung,

- aus den Intermediaten, die sich in den Strohanlässen ansammelten (Intermediate) (berechnet gemäß der Stöchiometrie des vollständigen Abbaus zu CH_4) (Tabelle 2-4)
- in Kontrollen mit (Kontrolle) und ohne (Boden Kontrolle) Stroh.

im Vergleich zur Summe der hier gezeigten CH_4 -Produktionsraten "Stroh", "Boden" und "Intermediate" (Summe), Trennung nach (A-1 und A-2) 7 Tagen, unterteilt in (A-1) logarithmische und (A-2) lineare Phase der Methanbildung, Trennung nach (B) 28 Tagen und (C) 97 Tagen. Angaben beziehen sich auf 40 g Reisfeldboden und/oder 0,5 g Reisstroh vom Stiel pro Ansatz. (n = 3, Mittelwert Standardabweichung)

3.4.1.3 pH-Wert

Der pH-Wert war in allen Ansätzen über die Zeit der Inkubation konstant. Tabelle 3-8 gibt eine Übersicht über die pH-Werte in den Boden-, Stroh- und Kontrollansätzen nach der Trennung von Boden und Stroh zu verschiedenen Zeitpunkten. In den Strohanansätzen lag der pH-Wert bei 7,0 - 7,2, in den Bodenansätzen und Kontrollen bei 6,6 - 6,8 (Tabelle 3-8).

Tabelle 3-8: Konstante pH-Werte in den Boden-, Stroh- und Kontrollansätzen nach der Trennung von Boden und Stroh zu verschiedenen Zeitpunkten.

	pH-Wert bei der Trennung nach		
	7 Tagen ¹	28 Tagen ¹	97 Tagen ²
Kontrolle	6,6 ± 0,04	6,7 ± 0,03	6,8 ± 0,04
Bodenansatz	6,7 ± 0,08	6,8 ± 0,05	6,8 ± 0,08
Strohanansatz	7,0 ± 0,07	7,1 ± 0,05	7,2 ± 0,04

¹ (n = 21, Mittelwert ± Standardabweichung) ² (n = 15, Mittelwert ± Standardabweichung)

3.4.1.4 Thermodynamische Berechnungen

Da sich Acetat und Propionat in den Strohanansätzen anhäuften, sollten Berechnungen zeigen, ob deren weiterer Abbau, der syntrophe Propionatabbau und die acetoklastische Methanogenese, thermodynamisch gehemmt waren. Der Propionatabbau war in den Strohanansätzen jeweils für einen bestimmten Zeitraum endergonisch (Tabelle 3-9), da in dieser Zeit die Konzentration des Substrates Propionat im Vergleich zu den Konzentrationen der Produkte H₂ und Acetat niedrig war. Mit steigender Propionatkonzentration wurde die Reaktion jedoch in allen Ansätzen exergonisch. Der Abbau von Acetat zu CH₄ war zu allen Zeitpunkten in allen Ansätzen mit Reaktionsenthalpien von - 45 bis - 30 kJ mol⁻¹ Acetat exergonisch und damit thermodynamisch nicht gehemmt.

Tabelle 3-9: Freie Reaktionsenthalpie ΔG [kJ/Reaktion], die für den syntrophen Propionatabbau und die acetoklastische Methanogenese zur Verfügung standen in Ansätzen mit Boden oder Stroh nach Trennung der Kompartimente nach 7, 28 und 97 Tagen und in Kontrollen

Ansätze ¹ nach der Trennung zu den angegebenen Zeitpunkten		ΔG [kJ/Reaktion] zum angegebenen Zeitpunkt [Tage]							
<u>syntropher Propionatabbau</u>									
7 Tage	7	8	10	13	16	21	24	30	
Stroh	-1,5	3,5	2,6	3,6	5,0	1,2	-3,5	-0,6	
Boden	-4,6	4,1	4,2	5,5	-10,8	-24,7	-20,1	-12,2	
Kontrolle	-7,5	3,8	5,1	-1,1	-12,7	-23,0	-23,1	-18,4	
28 Tage	28	31	36	42	49	52	65		
Stroh	-25,2	3,9	-0,2	-8,5	-8,8	-7,1	-15,9		
Boden	-26,2	-17,3	-13,7	-17,2	-19,2	-11,5	-14,5		
Kontrolle	-18,9	-9,0	-4,4	-6,4	-4,1	-7,9	-13,6		
97 Tage	97	98	100	103	106	110	114	118	
Stroh	-5,8	5,0	6,1	4,0	3,8	1,8	-1,9	-3,6	
Boden	-18,7	-9,0	-18,8	-16,6	-15,3	-16,5	-17,1	-13,2	
Kontrolle	-16,8	-9,2	-8,5	-10,8	-12,3	-10,4	-12,3	-9,5	
<u>Methanbildung aus Acetat</u>									
7 Tage	7	8	10	13	16	21	24	30	
Stroh	-42,0	-43,7	-45,4	-44,3	-42,8	-41,6	-40,5	-39,0	
Boden	-48,1	-41,4	-29,9	-32,3	-25,2	-15,5	-14,0	-14,2	
Kontrolle	-49,0	-43,2	-36,8	-29,3	-27,5	-17,1	-18,2	-16,3	
28 Tage	28	31	36	42	49	52	65		
Stroh	-36,8	-40,3	-38,5	-36,4	-36,5	-38,8	-37,9		
Boden	-37,6	-29,5	-28,3	-25,5	-23,4	-27,5	-28,7		
Kontrolle	-33,8	-24,7	-23,0	-20,9	-20,0	-18,9	-14,1		
97 Tage	97	98	100	103	106	110	114	118	
Stroh	-29,9	-33,9	-33,6	-33,2	-33,3	-33,2	-33,1	-32,4	
Boden	-29,6	-27,4	-23,3	-24,9	-24,8	-21,0	-27,4	-23,4	
Kontrolle	-28,9	-25,7	-25,7	-25,9	-22,8	-21,8	-20,6	-19,8	

Die ΔG -Werte wurden berechnet aus den Konzentrationen, die in den Abbildung 3-20 bis 3-22 dargestellt sind, den ΔG^0 -Werten, in Tabelle 2-5 und den pH-Werten in Tabelle 3-8. Lag eine Konzentration unter dem Detektionslimit wurde eine Konzentration von 10 μM eingesetzt, um die Reaktionsenthalpien berechnen zu können, die für die Reaktionen zur Verfügung ständen, wenn die entsprechenden Intermediate in geringen Konzentrationen vorlägen.

¹ Ansätze mit Boden oder Stroh nach der Trennung und nicht getrennte Kontrollen.

3.4.2 Hydrolyse der Polysaccharide

Die Hydrolyse der Polysaccharide wurde zum einen über die Aktivität der hydrolytischen Enzyme Xylosidase, Glucosidase und Exoglucanase verfolgt, zum anderen über die Freisetzung reduzierender Zucker nach der Hemmung der Zuckeraufnahme in die Zellen durch Toluol.

3.4.2.1 Potentielle Aktivität hydrolytischer Enzyme

Die potentielle Aktivität der hydrolytischen Enzyme wurde nach der Trennung von Boden und Stroh nach 7, 30 und 113 Tagen durch den Zusatz von MUF-Substraten bestimmt. Die Enzymaktivität war unabhängig davon, wann die Kompartimente getrennt wurden, in den Bodenansätzen höher als in den Strohansätzen. Während die Aktivitäten der Enzyme jedoch in den Strohansätzen mit der Zeit anstiegen, blieben sie im Boden relativ konstant (Abbildung 3-25). Die Aktivität der Xylosidase und der Glucosidase waren nach 7 Tagen in den Bodenansätzen ungefähr 8 mal so hoch wie in den Strohansätzen (Abbildung 3-25 A), nach 113 Tagen aber nur noch ungefähr 2,5 mal so hoch (Abbildung 3-25 C). Die Aktivität der Exoglucanase dagegen war in den Bodenansätzen nach 7 bzw. 30 Tagen nicht ganz doppelt so hoch wie in den Strohansätzen (Abbildung 3-25 A und B) und nach 113 Tagen war die Aktivität in den Strohansätzen geringfügig höher (Abbildung 3-25 C).

Im Vergleich zu Ansätzen, in denen Boden von Anfang an ohne Stroh inkubiert wurde, war die Aktivität in Boden, der zuvor mit Stroh inkubiert wurde, bei allen Enzymen und zu allen Zeitpunkten deutlich höher (Abbildung 3-25).

Beim Waschen des Stroh nach der Trennung wurden die Enzyme möglicherweise abgelöst. Die Summe der Aktivitäten der verschiedenen Enzyme in den getrennten Ansätzen war jedoch mit wenigen Ausnahmen vergleichbar mit der Aktivität in den nicht getrennten Kontrollen (Tabelle 3-10), so dass davon ausgegangen werden kann, dass keine Aktivität verloren ging. Das Stroh wurde zusätzlich nach der Trennung in Puffer weiter inkubiert, so dass neue Enzyme von den Mikroorganismen am Stroh gebildet werden und dann an das Stroh binden könnten. Nach einer erneuten Inkubationszeit von 8 Tagen wurden die Enzymtests durchgeführt. Zur Kontrolle wurde auch der Boden für diese Zeit inkubiert und dann in den Enzymtest eingesetzt. Beim Vergleich der Enzymaktivitäten in den Boden- und Strohansätzen zeigte sich jedoch, dass die Aktivitäten in den Bodenansätzen weiterhin höher waren als die in den Strohansätzen (Abbildung 3-26).

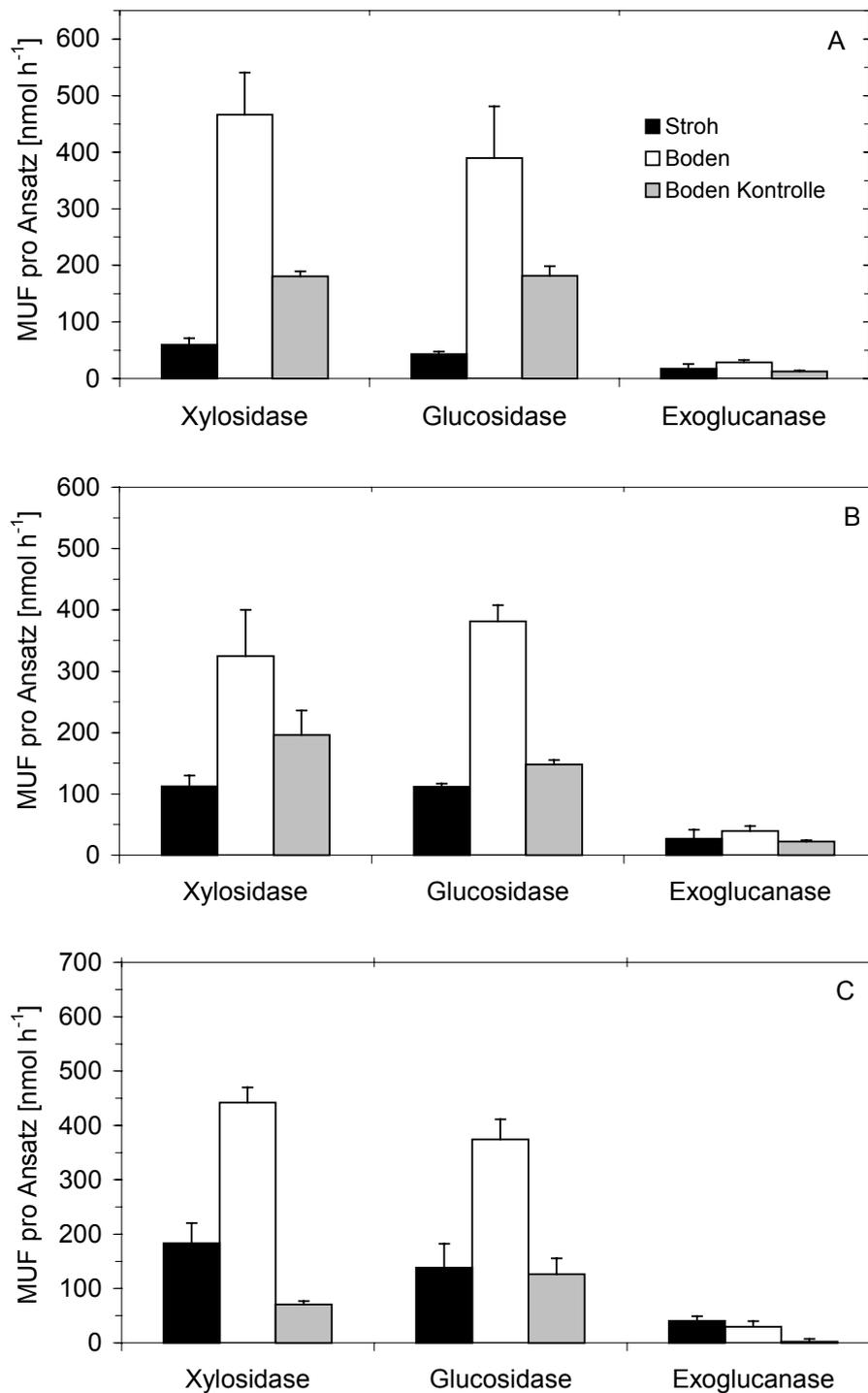


Abbildung 3-25: Aktivität der Xylosidase, Glucosidase und Exoglucanase in Ansätzen mit Boden bzw. Stroh nach der Trennung und in Kontrollansätzen ohne Stroh; Trennung der Kompartimente nach (A) 7, (B) 30 und (C) 113 Tagen gemeinsamer Inkubation. Angaben beziehen sich auf 1,5 g Reisfeldboden und 0,02 g Reisstroh vom Stiel pro Ansatz. (n = 3, Mittelwert ± Standardabweichung)

Tabelle 3-10: Summe der Aktivitäten von Xylosidase, Glucosidase und Exoglucanase in Ansätzen mit Boden bzw. Stroh nach der Trennung der Kompartimente im Vergleich zu nicht getrennten Kontrollen.

Trennung nach	in	Enzymaktivität pro Ansatz [$\mu\text{mol MUF h}^{-1}$]		
		Xylosidase	Glucosidase	Exoglucanase
7 Tagen	Boden + Stroh ¹	525	433	46
	Kontrolle	289 \pm 14	411 \pm 32	39 \pm 9
30 Tagen	Boden + Stroh ¹	437	493	66
	Kontrolle	482 \pm 97	333 \pm 56	80 \pm 24
113 Tagen	Boden + Stroh ¹	625	513	70
	Kontrolle	357 \pm 83	382 \pm 93	47 \pm 31

Angaben beziehen sich auf 1,5 g Reisfeldboden und 0,02 g Reisstroh vom Stiel pro Ansatz.
(n = 3, Mittelwert \pm Standardabweichung)

¹ Summe der Aktivitäten in den Strohanansätzen (Stroh) und Bodenansätzen (Boden) nach der Trennung.

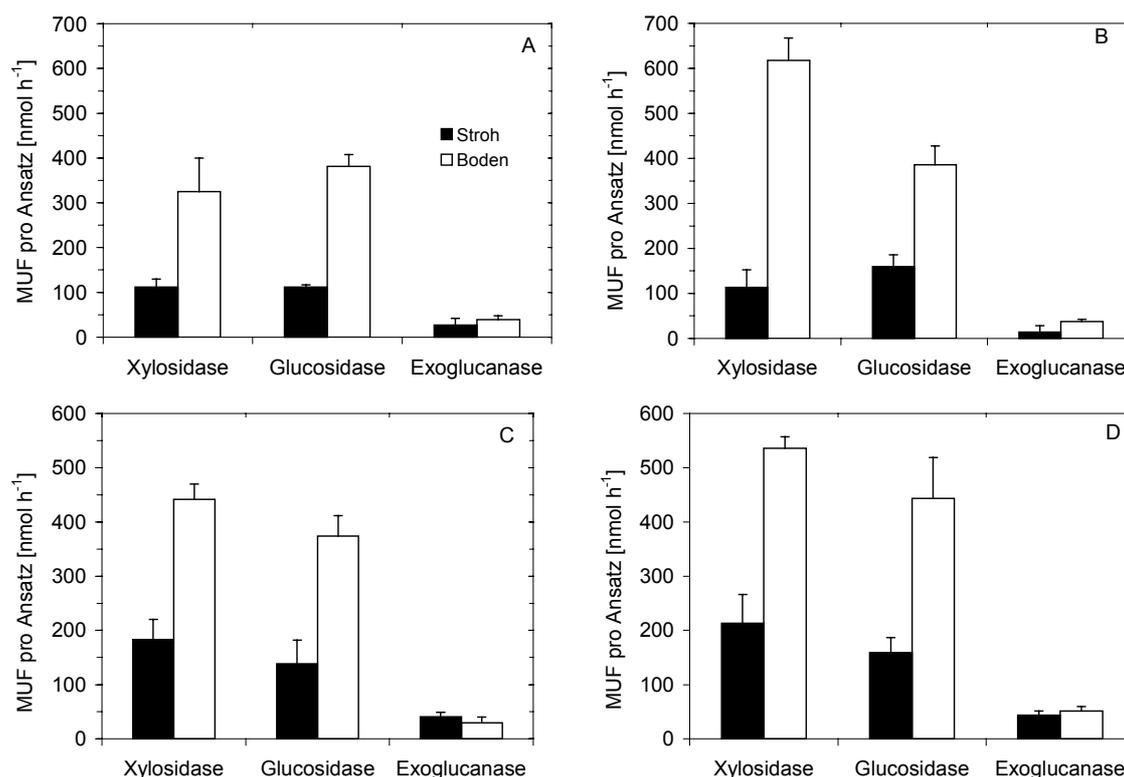


Abbildung 3-26: Aktivitäten der Xylosidase, Glucosidase und Exoglucanase in Ansätzen mit Boden bzw. Stroh nach der Trennung nach (A, B) 30 Tagen oder nach (C, D) ungefähr 120 Tagen; Die Aktivitäten wurden (A, C) direkt nach der Trennung oder (B, D) nach Inkubation der getrennten Ansätze für 8 Tage bestimmt. Angaben beziehen sich auf 1,5 g Reisfeldboden und 0,02 g Reisstroh vom Stiel pro Ansatz. (n = 3, Mittelwert \pm Standardabweichung)

3.4.2.2 Freisetzung reduzierender Zucker

Die Kompartimente Boden und Stroh wurden nach 7, 27 und 126 Tagen voneinander getrennt und nach der Zugabe von Toluol weiter inkubiert, um die Freisetzung reduzierender Zucker messen zu können. Im Gegensatz zur potentiellen Aktivität der hydrolytischen Enzyme war die Freisetzung der Zucker nach 7 und 27 Tagen in den Strohansätzen dreimal so hoch wie in den Bodenansätzen (Abbildung 3-27). Nach 126 Tagen war in den Bodenansätzen im Gegensatz zu den Strohansätzen keine Freisetzung von Zuckern mehr nachweisbar. Die Freisetzung von Zuckern in Ansätzen, in denen Boden von Anfang an ohne Stroh inkubiert wurde, war ähnlich der in den Bodenansätzen (7 Tage) oder geringfügig höher (27 Tage) (Abbildung 3-27).

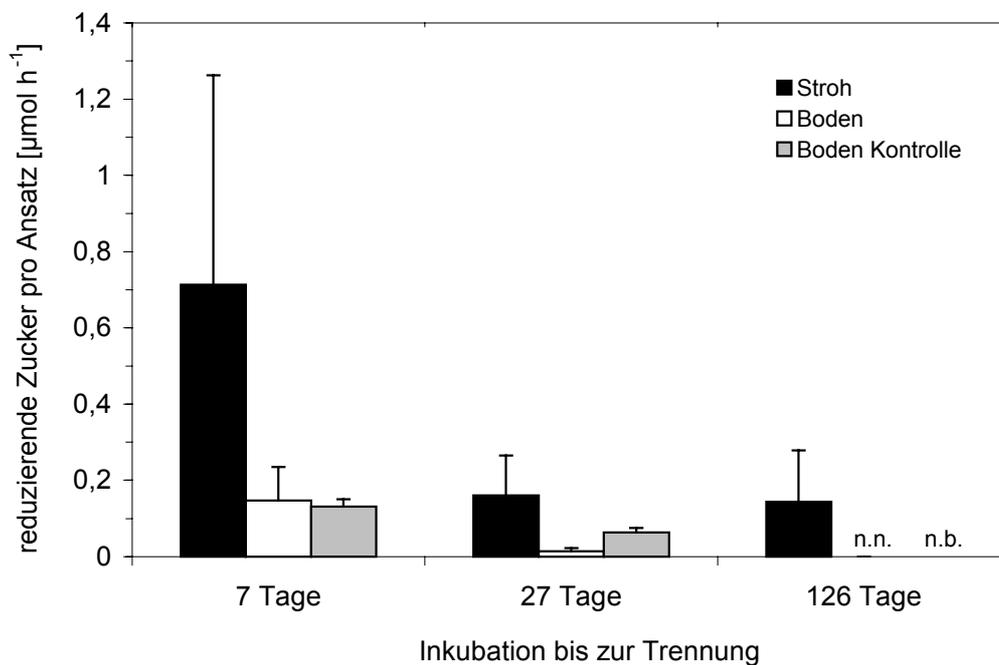


Abbildung 3-27: Freisetzung von reduzierenden Zuckern in Ansätzen mit Boden bzw. Stroh nach der Trennung nach 7, 27 oder 126 Tagen und in nicht getrennten Kontrollen. Angaben beziehen sich auf 20 g Reisfeldboden und 0,02 g Reisstroh vom Stiel pro Ansatz. (n = 3, Mittelwert ± Standardabweichung) n.n. = nicht nachweisbar, n.b. = nicht bestimmt

Der Vergleich der Summe der Zucker, die in den getrennten Ansätzen freigesetzt wurden, mit Kontrollen zeigte, dass die gesamte Aktivität in den Kontrollen in den getrennten Ansätzen wiedergefunden werden konnte (Tabelle 3-11).

Tabelle 3-11: Vergleich der Summe der Freisetzung von reduzierenden Zuckern in Ansätzen mit Boden bzw. Stroh nach der Trennung mit der Freisetzung in nicht getrennten Kontrollen.

Trennung nach	Freisetzung reduzierender Zucker [$\mu\text{mol h}^{-1}$]	
	Summe der Freisetzung in getrennten Ansätze	Kontrolle
7 Tagen	0,86	$0,8 \pm 0,13$
27 Tagen	0,17	$0,14 \pm 0,02$
126 Tagen	0,14	$0,11 \pm 0,02$

Angaben beziehen sich auf 20 g Reisfeldboden und 0,02 g Reisstroh vom Stiel pro Ansatz.
($n = 3$, Mittelwert \pm Standardabweichung)

4 Diskussion

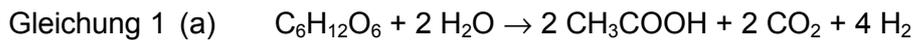
In der vorliegenden Arbeit wurden zunächst die Prozesse verfolgt, die am anaeroben Abbau von Reisstroh in Reisfeldboden beteiligt sind (Abbildung 1-1), die Fermentation, die Methanogenese (Kapitel 4.1) und die Hydrolyse der Biopolymere (Kapitel 4.2). Die Hydrolyse der Biopolymere war der erste Schritt des Abbaus, gefolgt von der Fermentation. CH_4 war das Endprodukt dieser Abbauprozesse, dessen Produktion direkt von der Bildung und dem syntrophen Umsatz der als Intermediate des Abbaus gebildeten Fermentationsprodukte abhing. Im Vergleich der Abbauprozesse wird deutlich, welcher der verschiedenen Schritte limitierend für die Methanbildung ist (Kapitel 4.3). Außerdem zeigte sich durch die Trennung der Kompartimente Boden und Stroh nach der Inkubation, dass die Abbauprozesse unterschiedlich auf diese Kompartimente verteilt sind (Kapitel 4.4).

4.1 Fermentation und Methanogenese

Die Intermediate des anaeroben Abbaus von organischem Material sind Gärungsprodukte, Wasserstoff (H_2) und Kohlendioxid (CO_2), die Endprodukte sind Methan (CH_4) und CO_2 (Abbildung 1-1). Die Produktion von CH_4 , CO_2 , H_2 und Gärungsprodukten in Reisfeldboden wurde durch die Zugabe von Reisstroh verstärkt (Abbildung 3-6 und 3-7). Dabei hing die Bildung von H_2 , CO_2 und CH_4 von der Menge des eingesetzten Strohs ab (Abbildung 3-7). Die Abhängigkeit der Methanproduktion von der Menge des eingebrachten organischen Materials wurde auch schon in Feldversuchen und in Versuchen mit Mikrokosmen beobachtet (Watanabe *et al.* 1995, Chidthaisong *et al.* 1996, Chidthaisong und Watanabe 1997, Kimura 1997, Watanabe *et al.* 1998). Die Produktion von CH_4 begann mit einer kurzen lag-Phase, stieg danach aber stark an und ging dann über in eine Phase mit konstanten Bildungsraten (Abbildung 3-6). Diese verschiedenen Phasen wurden bereits in anderen Untersuchungen bei der anaeroben Inkubation von Reisfeldboden beobachtet (van Hulzen *et al.* 1999, Yao und Conrad 1999, Yao *et al.* 1999). Auf die Faktoren, die für die unterschiedliche Methanbildung in diesen Phasen verantwortlich sind, wird in Kapitel 4.3. näher eingegangen. Die Produktion von CO_2 stieg im Gegensatz zur Methanbildung schon zu Anfang der Inkubation an (Abbildung 3-6). Diese Ergebnisse stimmten mit früheren Untersuchungen zum Einfluss von organischem Material auf Reisfeldboden überein (Chin und Conrad 1995, Chidthaisong *et al.* 1999, Chidthaisong und Conrad 2000, Villegas-Pangga *et al.* 2000). Als Grund für die anfangs hohe CO_2 -Produktion

wird dabei die Reduktion von Nitrat, Eisen (Fe^{3+}) und Sulfat gesehen, was typisch für die Anfangsphase, die sogenannte Reduktionsphase, der anoxischen Inkubation von Reisfeldboden ist. Die CH_4 -Produktion wird in der methanogenen Phase dominant, wenn Eisen und Sulfat reduziert sind (Krylova *et al.* 1997, Klüber und Conrad 1998, Yao und Conrad 1999, Yao *et al.* 1999).

Experimente mit radioaktiv markiertem Bicarbonat haben gezeigt, dass in den Ansätzen mit Stroh H_2/CO_2 ungefähr 25 % zur Produktion von CH_4 beitrugen (Tabelle 3-5), ohne Stroh waren es nur 10 %, d. h. Acetat trug 75 bzw. 90 % zur Methanbildung bei. Die Intermediate, die sich nach der Hemmung mit BES (2-Bromethansulfonsäure) in Ansätzen mit oder ohne Stroh ansammelten, würden laut der Stöchiometrie des vollständigen Abbaus zu CH_4 zu 84 bis 89 % über Acetat zu CH_4 umgesetzt (Tabelle 3-6). In jedem Fall war der Beitrag von Acetat zur CH_4 -Bildung 75 bis 90 %. Dies war höher als die theoretisch laut den folgenden Gleichungen 1 (b) und (d) beim Abbau von Polysacchariden erwarteten 66 % (Rothfuss und Conrad 1993, Chin und Conrad 1995, Conrad 1999):



Ein höherer Anteil der CH_4 -Bildung aus Acetat deutet darauf hin, dass die Homoacetogenese ein wichtiger Prozess beim anaeroben Abbau von Reisstroh ist. Ein wesentlicher Beitrag der Acetatbildung aus H_2/CO_2 war dabei aber unwahrscheinlich, da die freien Reaktionsenthalpien (ΔG -Werte) des Prozesses ($\Delta\text{G} = -6$ bis 0 kJ mol^{-1} Acetat, Tabelle 3-7) höher waren als die ΔG -Werte, die Homoacetogene in Rein- oder Mischkulturen benötigten ($\Delta\text{G} = -8$ bis -24 kJ mol^{-1} Acetat) (Conrad und Wetter 1990, Seitz *et al.* 1990, Peters *et al.* 1998). Wahrscheinlicher ist, dass das homoacetogen gebildete Acetat direkt aus der Vergärung der Kohlenhydrate stammte. Nach der Hemmung mit BES stiegen die H_2 -Konzentrationen an und der ΔG -Wert der Acetatbildung aus H_2/CO_2 sank auf -23 kJ mol^{-1} Acetat. Dadurch wurde auch Acetatbildung aus H_2/CO_2 möglich. Vergleichbar dazu konnte in marinen Sedimenten ein Beitrag von H_2/CO_2 zur Acetatbildung nachgewiesen werden, wenn die H_2 -Konzentrationen saisonal bedingt anstiegen (Hoehler *et al.* 1999). Ein relativ hoher Anteil von Acetat an der Methanbildung wurde ebenfalls schon in früheren Untersuchungen gefunden, in denen dieser auf eine bedeutende Beteiligung der Homoacetogenese an den Abbauprozessen zurückgeführt wurde (Krumböck und Conrad 1991, Chin und Conrad 1995, Krylova *et*

al. 1997). In den Versuchen von Thebrath *et al.* (1992) stammten ungefähr 10 % des Acetats während der konstanten Methanbildung aus der Homoacetogenese.

Durch die Zugabe von Reisstroh wurde neben der Produktion von CH_4 und CO_2 die anfängliche aber vorübergehende Anhäufung von Gärungsprodukten während der Reduktionsphase verstärkt (Abbildung 3-8). Auch im Reisfeldboden ohne Stroh sammelten sich vorübergehend Gärungsprodukte an (Tabelle 3-4). Es waren jedoch weniger verschiedene und die Konzentrationen waren in Ansätzen ohne Stroh viel geringer als mit Stroh. Die Bedeutung der in Ansätzen mit Stroh gefundenen Gärungsprodukte unterschieden sich je nach Strohfraktion, die inkubiert wurde (Tabelle 3-4). Während Propionat nach Acetat in Ansätzen mit Stroh von der Blattscheide oder der Blattspreite das häufigste Gärungsprodukt war, waren die Konzentrationen von Butyrat und Caproat nach der von Acetat in Ansätzen mit Stielstroh am höchsten. Außerdem wurde in Ansätzen mit Stielstroh mehr Acetat und H_2 gebildet als in den anderen Ansätzen (Tabelle 3-4 und Abbildung 3-6). Diese Unterschiede können wohl auf die unterschiedliche chemische Zusammensetzung der Strohfraktionen zurückgeführt werden. So enthält das Stielstroh z. B. weniger Hemicellulose und Silikate als die anderen Teile der Reispflanze, aber mehr Cellulose (Shen *et al.* 1998). Joulain *et al.* (1996) beobachteten Unterschiede im Reisfeldboden beim Abbau von Cellulose und Xylan, der wohl am weitesten verbreiteten Hemicellulose. Hemicellulosen und Silikate sind beide Bestandteile des Strohs, die Einfluss auf den Abbau des gesamten Strohs nehmen können. Hemicellulosen umgeben die Cellulosefibrillen, so dass die Hemicellulose erst zum Teil abgebaut werden muss, bevor die Cellulose für die hydrolytischen Enzyme zugänglich wird (Leshine 1995). Silikate beeinflussten die Kolonisierung des Strohs durch Mikroorganismen (Bae *et al.* 1997).

Die Gärungsprodukte als Intermediate des anaeroben Abbaus verschiedener Strohfraktionen wurden auch in der methanogenen Phase bestimmt, wenn die Produktionsrate von CH_4 konstant war. Die Konzentrationen der Intermediate in den Ansätzen waren zu diesem Zeitpunkt sehr gering, aber konstant (gewöhnlich $< 100 \mu\text{M}$). Der Partialdruck von H_2 lag ebenfalls konstant bei 1,5 bis 6 Pa, wie es in dieser Phase des Abbaus schon häufiger beobachtet wurde (Chin und Conrad 1995, Krylova *et al.* 1997, Yao und Conrad 1999). Das Stroh wurde in dieser Phase hauptsächlich zu den Intermediaten H_2 , Acetat, Propionat, Butyrat, Isobutytrat, Valerat und Isovalerat vergoren, die sich nach der Hemmung der Methanogenese mit BES in den Ansätzen ansammelten (Tabelle 3-6). Die Hemmung der Bildung von CH_4 führte also nicht nur zu der Anhäufung der direkten Methanvorläufer Acetat und H_2 , sondern auch zur Anhäufung anderer Gärungsprodukte. Thermodynamische Berechnungen (Tabelle 3-7)

weisen darauf hin, dass Propionat, Butyrat, Valerat, Isobutyrat und Isovalerat ohne die Zugabe des Hemmstoffes weiter zu H_2 und Acetat abgebaut worden wären. Da jedoch durch die Hemmung der Methanogenese der Verbrauch von H_2 und Acetat verringert wurde, unterlagen die syntrophen Abbauprozesse einer thermodynamischen Hemmung. Diese Methode der Hemmung der Methanogenese, der daraus folgenden Ansammlung der Methanvorläufer und der thermodynamisch bedingten Anhäufung von Gärungsprodukten wird häufig benutzt, um die am anaeroben Abbau beteiligten Intermediate zu untersuchen (Suh *et al.* 1992, Rothfuss und Conrad 1993, Chin und Conrad 1995, Schulz und Conrad 1996).

Im Gegensatz zur Reduktionsphase, in der sich die Konzentrationen der Intermediate, die sich in den Ansätzen mit Stielstroh vorübergehend ansammelten, von denen in den anderen Ansätzen unterschieden, waren diese während der methanogenen Phase bei allen Strohfraktionen relativ einheitlich (Tabelle 3-6). Acetat war das wichtigste Intermediat während des Abbaus von Reisstroh, gefolgt von Propionat. Massenbilanzierungen zeigten, dass diese beiden Fettsäuren für nahezu die gesamte CH_4 -Produktion verantwortlich waren. Tsutsuki und Ponnampereuma (1987) identifizierten Isovalerat in anoxischem Reisfeldboden als wichtiges Intermediat, besonders nach dem Zusatz von Gründünger. In dieser Arbeit wurde Isovalerat dagegen nur in kleinen Mengen gefunden (Tabelle 3-6). Chin und Conrad (1995) fanden auch Caproat als Intermediat im Reisfeldboden ohne den Zusatz von Stroh. Hier sammelte sich in keinem der verschiedenen Ansätze Caproat nach der Hemmung der Methanogenese mit BES an (Tabelle 3-6), obwohl es während der Reduktionsphase, in der die Eisen- und Sulfatreduktion dominierten, beobachtet worden war (Tabelle 3-4). Bestätigt wurden diese Ergebnisse dadurch, dass sich Caproat auch nicht wie Acetat, Propionat und andere Intermediate in Ansätzen ansammelte, in denen Stroh nach der Trennung von Boden weiter inkubiert wurde (Abbildung 3-20). Caproat war demnach kein wichtiges Intermediat des anaeroben Abbaus. Andere Intermediate wie Lactat, Succinat, Formiat, Ethanol oder Isopropanol, die in früheren Versuchen mit Reisfeldboden nachgewiesen wurden, konnten in dieser Arbeit nicht als Intermediate detektiert werden (Krumböck und Conrad 1991, Chin und Conrad 1995, Joulian *et al.* 1996). In den Versuchen von Acharya (1935) zum Abbau von Reisstroh wurden in der methanogenen Phase hauptsächlich Acetat und Butyrat gefunden, Formiat, Lactat, Propionat und Valerat hingegen nur in geringen Konzentrationen. Die Konzentrationen wurden jedoch ohne Hemmung der Methanogenese bestimmt und entsprachen demnach den konstanten geringen Werten, die auch in dieser Arbeit während der methanogenen Phase in den nicht gehemmten Kontrollen gemessen wurden. Über die Beteiligung der

verschiedenen Intermediate an der Methanbildung lassen sich daraus keine Schlüsse ziehen.

Neben den oben genannten Intermediaten wurden in Ansätzen mit Stroh, jedoch nicht in Ansätzen ohne Stroh, auch einige bislang unbekannt Verbindungen durch die HPLC ("High pressure liquid chromatography")-Analyse gefunden. Die relativen Flächeneinheiten, die proportional zur Konzentration sind, zeigten eine vorübergehende Anhäufung zu Beginn der Inkubation und auch eine Anhäufung nach der Zugabe von BES, d. h. ein für Intermediate des anaeroben Abbaus typisches Verhalten (siehe Kapitel 3.2.4). Dass unidentifizierte Verbindungen im Porenwasser gefunden werden, ist nicht ungewöhnlich (Albert und Martens 1997). In den hier gezeigten Experimenten hatten diese in der HPLC Retentionszeiten von mehr als 15 Minuten und wurden nur durch die UV-Absorption detektiert. Möglicherweise handelte es sich um phenolische Ligninderivate. Der Abbau von Lignin unter anoxischen Bedingungen wurde zwar lange nicht für möglich gehalten, ist aber inzwischen mehrmals nachgewiesen worden (Zeikus 1980, Benner *et al.* 1984, Colberg 1988, Kondo *et al.* 1998). Tsutsuki und Ponnamparuma (1987) beobachteten die Produktion von phenolischen Verbindungen (p-Hydroxybenzoesäure, Vanillinsäure, p-Cumarinsäure, Ferularsäure und Sinapinsäure) in Reisfeldboden, besonders nach der Zugabe von Reisstroh. Auch beim anaeroben Abbau von Lignin und Lignin-Kohlenhydrat-Komplexen in anderen Gräsern konnte die Freisetzung von löslichen Ligninfragmenten mit phenolischen Säuren beobachtet werden (Kondo *et al.* 1998). Auch der Abbau von Ligninderivaten zu CH₄ wurde in verschiedenen Untersuchungen beobachtet (Zeikus 1980, Berry *et al.* 1987, Colberg 1988). Ob es sich bei den in dieser Arbeit gefundenen Verbindungen um Ligninderivate handelte, soll sich in weiteren Untersuchungen mit einem Massenspektrometer und im Vergleich von Ligninderivaten und den unbekannt Substanzen in der HPLC zeigen. Ungeachtet dessen, um welche Verbindungen es sich handelte, trugen die in dieser Arbeit gefundenen nicht identifizierten Substanzen nur wenig zur Methanbildung bei. Denn alleine die bekannten Intermediate, die sich aufgrund der Zugabe von BES ansammelten, würden bei vollständigem Abbau zu CH₄ die in den Kontrollen gebildete CH₄-Menge gut ausgleichen (ungefähr 80 %, Tabelle 3-6).

In Reisfeldboden waren die Intermediate ohne Stroh sehr ähnlich wie mit Stroh, auch hier wurden Acetat und Propionat in den höchsten Konzentrationen gefunden (Tabelle 3-6). Aus diesen Beobachtungen kann geschlossen werden, dass das organische Bodenmaterial eine ähnliche Zusammensetzung wie Reisstroh hatte. Diese Annahme liegt nahe, weil der größte Teil des organischen Bodenmaterials ursprünglich

aus der Primärproduktion stammt, d. h. in diesem Fall aus Reisstroh. Reisstroh und andere abgestorbene Teile der Reispflanzen tragen zur organischen Bodenmasse bei. Die Halbwertszeit von Reisstroh im Reisfeldboden beträgt ungefähr 2 Jahre, wobei 80 bis 90 % im ersten Jahr abgebaut werden (Neue und Scharpenseel 1987). Selbst wenn dem Boden kein neues Reisstroh zugegeben wurde, enthielt es noch Strohpartikel vom Vorjahr, die vergleichbar zum frischen Stroh methanogen abgebaut wurden. Die Unterscheidung zwischen organischem Bodenmaterial auf der einen Seite und Stroh auf der anderen Seite ist nicht eindeutig. Weitere Untersuchungen über den Zerfall und den mikrobiellen Abbau von Reisstroh sind notwendig, um die Abbauprozesse und die Verstärkung der CH_4 -Produktion auf längere Sicht hin zu verstehen.

Zusammenfassend kann man sagen, dass es größere Unterschiede in der Bildung von Intermediaten des anaeroben Abbaus und von CH_4 in Reisfeldboden ohne Reisstroh oder mit verschiedenen Strohfraktionen nur in der Anfangsphase des Abbaus gab, als die Methanbildung noch keine konstanten Raten erreicht hatte. Danach hatte das Reisstroh nur noch geringen Einfluss auf die Intermediate, die während der Abbauprozesse gebildet wurden. Acetat und Propionat waren in allen Ansätzen die wichtigsten Intermediate und CH_4 wurde hauptsächlich aus Acetat gebildet. Ob dieser Unterschied zwischen der frühen Phase und der späteren Phase auf Änderungen in der mikrobiellen Gemeinschaft oder auf die Struktur oder Zusammensetzung des Strohs zurückzuführen war, ist nicht bekannt.

4.2 Hydrolyse der Polysaccharide

Die Hauptbestandteile von Reisstroh sind Cellulose, Hemicellulose und Lignin (Watanabe *et al.* 1993, Grant 1998, Shen *et al.* 1998). Ihre Hydrolyse ist daher der erste Schritt im anaeroben Abbau des Reisstrohs (vergleiche Kapitel 1.2). Der anaerobe Abbau von Lignin verläuft nur relativ langsam (Benner *et al.* 1984). Die Untersuchung der hydrolytischen Aktivität beschränkte sich in dieser Arbeit daher auf die Hydrolyse der Polysaccharide, die von extrazellulären Enzymen, den Cellulasen und Hemicellulasen katalysiert wird.

Bei der Untersuchung der hydrolytischen Aktivitäten wurde zwischen der aktuellen und der potentiellen Aktivität unterschieden (Boschker und Cappenberg 1994). Die potentielle Aktivität wurde durch den Zusatz von künstlichen Substraten in Sättigungskonzentrationen bestimmt. Sie spiegelte die Menge und Aktivität einzelner cellulolytischer oder hemicellulolytischer Enzyme unter den gegebenen Umweltbedingungen wieder,

wobei Faktoren, die mit dem natürlichen Substrat zusammenhingen (Substratkonzentration und -sättigung), nicht berücksichtigt wurden. Bei der aktuellen Aktivität handelte es sich dagegen um den Abbau der natürlich vorkommenden Substrate, d. h. der Polysaccharide bzw. die Freisetzung der Reaktionsprodukte, d. h. der Zuckermomere.

Die potentielle Aktivität der im Laufe des Abbaus gebildeten Enzyme wurde durch einen Test bestimmt, in dem Substrate eingesetzt wurden, die eine fluoreszierende Komponente enthalten. Diese Komponente, Methylumbelliferon (MUF), wird durch die Aktivität der Enzyme freigesetzt und kann fluorometrisch gemessen werden. Die Vorteile gegenüber Tests, in denen Substrate mit einer chromogenen Komponente eingesetzt werden, liegen darin, dass die freigesetzten fluorogenen Substanzen sensitiver gemessen werden können, die Inkubationszeiten kürzer sind und die Ergebnisse gut reproduzierbar sind (Meyer-Reil 1981, King 1986, Holzapfel-Pschorn *et al.* 1987, Hood 1991). Unter vier verschiedenen Testsystemen zur Bestimmung der Chitinaseaktivität war der Test mit einem MUF-Substrat unter den sensitivsten, hatte die kürzeste Inkubationszeit, war gut reproduzierbar, und die Vorbereitung war am wenigsten aufwendig (Hood 1991). Der Test ist sauerstoffunabhängig und wurde bereits in marinen und Seesedimenten eingesetzt (King 1986, Boschker und Cappenberg 1994).

Am Abbau von Cellulose und Hemicellulose sind verschiedene Enzyme beteiligt. In dieser Arbeit wurden drei verschiedene Enzyme ausgewählt, deren Aktivitäten bestimmt wurden. Die Exo- β -1,4-Glucanase und die β -Glucosidase sind am Abbau der Cellulose beteiligt. Sie spalten Cellobiose bzw. Glucose vom Ende des Polymers ab. Als Vertreter der Hemicellulasen wurde Xylosidase gewählt. Sie setzt aus Xylan Xylose frei, die in Reisstroh als Hauptbestandteil der Hemicellulose identifiziert wurde (Murayama 1984). Im Gegensatz zur Bestimmung der potentiellen Aktivität einzelner Enzyme wurde bei der Messung der aktuellen Aktivität die gesamte Aktivität aller hydrolytischen Enzyme erfasst. So wurden dort z. B. auch die Endoglucanasen und Endoxylanase eingeschlossen, die Cellulose bzw. Xylan zufällig innerhalb der Ketten spalten und deren Aktivität mit MUF-Substraten nicht bestimmt werden konnten. Hierzu müssten andere künstliche Substrate mit chromogenen Komponenten, wie z. B. Remazol-Brilliant-Blue, verwendet werden (Wood und Kellogg 1988).

Die potentielle Aktivität der drei hier gewählten Enzyme stieg im Reisfeldboden durch die Zugabe von Reisstroh stark an (Abbildung 3-16). Eine geringe Aktivität war jedoch auch ohne die Induktion durch das organische Material nachweisbar (Abbildung 3-16 B). Dies stimmt mit anderen Untersuchungen im Reisfeldboden überein (A. Fey,

persönliche Mitteilung). Außerdem ist die Bereitstellung von Zuckermonomeren durch die Hydrolyse der Polysaccharide Voraussetzung für die CH_4 -Produktion, die auch in Reisfeldboden ohne den Zusatz von Reisstroh stattfand (Abbildung 3-6). Der Einfluss von Reisstroh auf die Enzymaktivitäten selbst wurde bislang nicht untersucht. Boschker und Cappenberg (1994) fanden jedoch, dass die Enzymaktivitäten von dem zur Verfügung stehenden organischen Material abhängig waren. Stemmer *et al.* (1999) beobachteten einen Anstieg der Xylanaseaktivität im Laufe des Abbaus von Maisstroh.

Zwischen den Aktivitäten der verschiedenen Enzyme gab es deutliche Unterschiede (Abbildung 3-16). Dies lässt vermuten, dass die unterschiedlichen Bestandteile des Strohs, Cellulose und Hemicellulose, unterschiedlich schnell abgebaut wurden. Dies hatte sich schon in anderen Untersuchungen durch chemische Analysen gezeigt (Murayama 1984, Moran *et al.* 1989). Ob dies auf unterschiedliche Aktivitäten der entsprechenden hydrolytischen Enzyme zurückzuführen war, wurde dort jedoch nicht geklärt.

Ebenso wie die Aktivität der anderen Enzyme erreichte auch die Xylanaseaktivität nach 11 Tagen konstante Werte (Abbildung 3-16). Stemmer *et al.* (1999) fanden, dass die Xylosidaseaktivität beim Abbau von Maisstroh erst nach 16 Wochen (ungefähr 112 Tage) den höchsten Wert erreichte, während die Aktivität in dieser Arbeit zu diesem Zeitpunkt bereits wieder leicht gesunken war. Vergleichbar dazu hatte sich in den Versuchen von Murayama (1984) gezeigt, dass die Saccharidbestandteile von Reisstroh schneller abgebaut wurden als die von Gerstenstroh. Zum Zeitpunkt der höchsten Enzymaktivität waren 30 bis 40 % des organischen Materials in den Experimenten von Stemmer *et al.* (1999) abgebaut. Er stimmte darin mit Sinsabough *et al.* (1994) überein, die die höchste Aktivität saccharolytischer Enzyme bei 45 % Verlust der organischen Masse erwarteten. Die Abnahme der organischen Masse im speziellen wurde in dieser Arbeit nicht bestimmt, so dass ein direkter Vergleich nicht möglich war. Nach 11 Tagen war jedoch der Verlust an Trockengewicht noch sehr gering (Abbildung 3-15), so dass ein so hoher Verlust an organischer Masse ausgeschlossen werden kann. Die Aktivität der hydrolytischen Enzyme stieg hier also im Vergleich zu den Untersuchungen von Sinsabough *et al.* (1994) und Stemmer *et al.* (1999) auch in Bezug auf den Verlust an Strohmasse relativ schnell an. Mögliche Gründe für einen schnelleren Anstieg der Enzymaktivität wären ein höherer Xylosegehalt im Reisstroh und damit eine höhere Substratkonzentration oder die bessere Verfügbarkeit von Xylose für die Xylosidase. Murayama (1984) führte den schnelleren Abbau des Reisstrohs darauf zurück. Daneben könnte sich im Reisfeldboden eine Mikroorganismengemeinschaft entwickelt haben, die an den Abbau von

Polysacchariden von vornherein besser angepasst ist, da in den Reisfeldboden, bevor er für die Laborexperimente genutzt wurde, wiederholt Stroh als Dünger eingebracht wurde. In Reisfeldern wurde ein höherer anfänglicher Zuckerabbau gemessen als in einem Hochlandboden, was auf eine besser angepasste Mikroorganismengemeinschaft hindeutete (Murayama 1984).

Ob die Enzymaktivität nach der Zugabe von Reisstroh auf Grund einer höheren Anzahl enzymproduzierender Mikroorganismen oder auf Grund einer höheren Aktivität pro Zelle stieg, ließ sich mit dem hier verwendeten Test nicht unterscheiden. In parallelen Untersuchungen der Mikroorganismen, die das Stroh besiedelten, wurde jedoch im gleichen Zeitraum, in dem sich die Enzymaktivität änderte auch Veränderungen der Eubakteriengemeinschaft gefunden (Weber *et al.*, Manuskript eingereicht). Bis zum 15. Tag der Inkubation von Stroh in Boden änderte sich die Zusammensetzung der Gemeinschaft. Danach waren kaum noch Änderungen zu beobachten. Schon nach einem Tag wurde bei der Erstellung einer Klonbibliothek ein hoher Prozentsatz an Bakterien gefunden, die an der Hydrolyse der Polymere beteiligt sein könnten, z. B. Clostridien der Cluster I, III und XIVa. Die Aktivitäten aller drei Enzyme erreichten nach 11 Tagen konstante Werte, obwohl sich bis dahin unterschiedliche Aktivitätsmuster im Laufe der Zeit zeigten (Abbildung 3-16). Der Vergleich der Zusammensetzung der bakteriellen Gemeinschaft mit der Enzymaktivität lässt vermuten, dass die Enzymaktivität auch durch eine veränderte Mikroorganismengemeinschaft beeinflusst wurde. Sinsabaugh *et al.* (1991) zufolge ist der Abbau von Pflanzenresten durch Enzyme ein Prozess, der von der Zusammensetzung der Gemeinschaft der Mikroorganismen abhängig ist.

Die aktuelle hydrolytische Aktivität wurde in dieser Arbeit als Freisetzung reduzierender Zucker gemessen. Ebenso wie die potentielle Aktivität stieg auch die aktuelle Aktivität durch die Zugabe von Stroh an (Abbildung 3-17), wie es für Enzymaktivitäten bei höheren Substratkonzentrationen zu erwarten ist. Anders als die potentielle Aktivität war die aktuelle Aktivität aber nur am ersten Tag hoch und sank mit der Zeit, bis sie nach 11 Tagen konstant blieb. Da die potentielle Aktivität zu diesem Zeitpunkt sogar höher war als am Anfang, kann eine Limitierung der tatsächlichen Substratumsetzung durch die Enzymmenge wohl ausgeschlossen werden. Ein weiterer Faktor, der die Aktivität von Enzymen bestimmt, ist die Substratkonzentration bzw. die Substratverfügbarkeit. Reisstroh enthält ungefähr 8 % wasserlösliche, leicht abbaubare Polysaccharide, die zu Anfang der Inkubation schnell umgesetzt werden konnten (Watanabe *et al.* 1993, Grant 1998). Die Abbaubarkeit der anderen Polysaccharide kann durch die Struktur der Biopolymere im Stroh eingeschränkt werden. Cellulose ist

von Hemicellulosen umgeben, die zuerst zum Teil abgebaut werden müssen, bevor die Cellulose für die hydrolytischen Enzyme zugänglich wird. Zusätzlich erschweren Querbindungen zwischen Hemicellulose und Lignin den Celluloseabbau (Leshine 1995). In Versuchen mit Boden aus einem tropischen Feuchtgebiet zeigte sich, dass der Gehalt von Lignin in organischem Material negativ mit der Abbaubarkeit zusammenhing (Miyajima *et al.* 1997). Ein Einfluss von Lignin auf den Abbau von Biopolymeren und die Besiedlung durch Mikroorganismen wurde auch in Versuchen mit Reisstroh beobachtet (Bae *et al.* 1997). Die Entfernung der Ligninbestandteile mit saurem Chlorit steigerte die Abbaubarkeit von Zeitungspapier von 50 % auf 75 bis 100 % (Stinson und Ham 1995). Beim mikrobiellen Abbau von Pflanzenmaterial wurden die leicht abbaubaren Bestandteile mit der Zeit im Verhältnis weniger und die schwerer abbaubaren blieben zurück (Moran *et al.* 1989). Der durch die genannten Faktoren erschwerte Abbau von Polysacchariden führte hier beim Abbau von Reisstroh zu einer verminderten Freisetzung von Zuckern im Laufe der Inkubation. Der Abbau von Cellulose war zwar direkt abhängig von der Cellulaseaktivität (Sinsabaugh *et al.* 1991), die aber wiederum von der Substratverfügbarkeit eingeschränkt wird, so dass letztendlich die Zugänglichkeit des Substrates entscheidend für die aktuelle Aktivität war.

Geht man davon aus, dass 1 Mol der reduzierenden Zucker gemäß der in Kapitel 4.1 beschriebenen Gleichung 1 (d) zu 3 Mol CH_4 umgesetzt würden, lassen sich die Mengen an CH_4 berechnen, die aus den sich ansammelnden Zuckern gebildet werden könnten. Diese Methanmengen wären in den Ansätzen zu erwarten, wenn die Zuckeraufnahme in die Zellen und damit der weitere Umsatz der Zucker nicht durch Toulou gehemmt wäre. In Ansätzen mit Reisstroh (mit 40 g Boden und 0,5 g Stroh) sollten demnach 24 bis 43 $\mu\text{mol CH}_4 \text{ h}^{-1}$ pro Ansatz gebildet werden, wenn die Freisetzung der Zucker konstante Werte erreicht hat (siehe Kapitel 3.3.3). Die tatsächliche gebildeten Methanmengen lagen jedoch in der Phase mit konstanter CH_4 -Produktion bei 42 bis 83 $\mu\text{mol d}^{-1}$ pro Ansatz. Sie waren also doppelt so hoch, und damit wäre auch die zweifache Menge der hier freigesetzten Zucker zu erwarten (siehe Kapitel 3.2.1). Eine mögliche Fehlerquelle in der Berechnung ist die Voraussetzung, dass es sich bei den reduzierenden Zuckern ausschließlich um Hexosen handelte. Es könnte sich auch um Dimere wie Cellobiose handeln oder um Pentosen, die Bestandteile der Hemicellulosen sind (Murayama 1984). In diesen Fällen könnte mehr bzw. weniger CH_4 pro Mol reduzierender Zucker gebildet werden, d. h. bei den hier berechneten Werten handelt es sich um geschätzte Werte. Eine weitere mögliche Erklärung für die geringere berechnete CH_4 -Bildung bzw. die zu geringe Ansammlung reduzierender Zucker wäre, dass noch weitere Substrate für den anaeroben Abbau zur Verfügung

ständen. Neben den Polysacchariden und die aus ihnen abgespaltenen Zucker gibt es jedoch keine anderen Substrate in nennenswerten Mengen für den weiteren anaeroben Abbau. Reisstroh besteht zu 69 bis 82 % aus Polysacchariden und 5 bis 15 % aus Lignin, der Rest sind größtenteils anorganische Bestandteile (Tsutsuki und Ponnamparuma 1987, Watanabe *et al.* 1993, Grant *et al.* 1998, Shen *et al.* 1998). Lignin wird jedoch unter anaeroben Bedingungen nur langsam abgebaut (Benner *et al.* 1984). Eine andere, wohl wahrscheinlichere Möglichkeit ist, dass durch Toluol die Zuckeraufnahme in die Zellen nicht vollständig gehemmt wurde oder auch die hydrolytischen Enzyme durch das Toluol zum Teil an Aktivität verloren. Versuche mit radioaktiv markierter Glucose und Xylose zeigten bei der Entwicklung der Methode für Sedimente, dass eine Aufnahme der Zucker in die Zellen nicht stattfand (Boschker *et al.* 1995). In den Experimenten von Meyer-Reil (1981) und King (1986) wurde die Aktivität hydrolytischer Enzyme jedoch teilweise durch Toluol gehemmt, obwohl dies bei Boschker *et al.* (1995) nicht der Fall war. Auch wenn die hier genannten Fehlerquellen berücksichtigt werden und die Freisetzung der Zucker den erwarteten Werten entsprechen, wäre die konstante aktuelle Aktivität jedoch im Vergleich zur potentiellen und zur anfänglichen aktuellen Aktivität gering, so dass sich am Gesamtbild der hydrolytischen Aktivität durch diese Korrekturen nichts ändern würde.

Außer der Hydrolyse der Polysaccharide wurde auch die Abnahme des Trockengewichtes und die rein optisch erkennbare Zersetzung des Reisstrohs in dieser Arbeit verfolgt (Abbildung 3-14 und 3-15). Das Gleiche wurde ebenfalls in vorangegangenen Untersuchungen und bei der Änderung der Zuckerzusammensetzung von Reisstroh beobachtet (Murayama 1984, Saito *et al.* 1994, Kimura und Tun 1999). Die Ergebnisse bestätigten, dass der Abbau des Strohs zu Anfang noch relativ schnell war, dann aber langsamer ablief.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die potentielle Aktivität der hydrolytischen Enzyme innerhalb von 11 Tagen anstieg, während die aktuelle Aktivität, d. h. die Freisetzung von Zuckermonomeren, sank. Grund für die geringe aktuelle Aktivität war vermutlich eine verminderte Zugänglichkeit der Polysaccharide für die hydrolytischen Enzyme durch Lignin oder im Fall von Cellulose durch Hemicellulose. Durch die im Laufe der Zeit verringerte aktuelle Aktivität nahm die Geschwindigkeit der Zersetzung des Strohs ab.

4.3 Limitierende Schritte bei der Methanbildung

Während der Inkubation von Reisstroh in Reisfeldboden waren vier Phasen erkennbar, in denen unterschiedliche Abbauschritte limitierend für die CH₄-Bildung waren. Deutlich wurde dies bei dem Vergleich der Konzentrationen verschiedener Zwischenprodukte des anaeroben Abbaus (reduzierende Zucker, H₂ und Acetat) und der Konzentration des Endproduktes CH₄ (Abbildung 1-1 und 4-1).

In Phase I, die nur wenige Stunden dauerte, sammelten sich die reduzierenden Zucker an, d. h. sie wurden schneller durch die Hydrolyse freigesetzt, als sie weiter umgesetzt werden konnten. Damit war die Gärung limitierend für die folgenden Abbauschritte. In Versuchen zum anaeroben Abbau von Glucose im Reisfeldboden hatte sich schon zuvor gezeigt, dass zu Beginn der Inkubation der Glucoseverbrauch sehr niedrig war (Chidthaisong *et al.* 1999).

In Phase II war die Methanogenese aus den Vorläufern H₂/CO₂ oder Acetat selbst der entscheidende Schritt. Alle Zucker, die sich zuvor angesammelt hatten, wurden verbraucht, so dass ihre Konzentration auf einen Schwellenwert absank. Stattdessen wurden Acetat und H₂ angehäuft, beides Produkte der Gärung und des syntrophen Abbaus anderer Gärungsprodukte und direkte Vorläufer des CH₄ (Abbildung 1-1). Als Grund für die zu Beginn eingeschränkte CH₄-Bildung bei der Inkubation unter anoxischen Bedingungen wird im allgemeinen die Anwesenheit anderer Elektronenakzeptoren wie Nitrat, Mangan (IV), Eisen (III) und Sulfat gesehen (Zehnder und Stumm 1988, Conrad 1993, Achtnich *et al.* 1995). Die Methanbildung kann erst stattfinden, wenn das Redoxpotential durch den Verbrauch dieser Reduktionsäquivalente gesunken ist. Die für die alternativen Reduktionsprozesse verantwortlichen Mikroorganismen konkurrieren außerdem erfolgreich mit den methanogenen *Archaea* um H₂ (Conrad *et al.* 1987, Achtnich *et al.* 1995). H₂ und Acetat standen hier jedoch im Überschuss zur Verfügung, so dass eine aus dieser Konkurrenz entstehende Substratlimitierung nicht der Grund für die geringe CH₄-Produktion sein konnte. Eine geringe Methanproduktion trotz hoher Konzentrationen von Acetat und H₂ zu Beginn der anaeroben Inkubation wurde auch von Peters und Conrad (1996) beobachtet. Das Redoxpotential war daher vermutlich der Faktor, durch den die Anwesenheit der alternativen Elektronenakzeptoren Einfluss auf die Methanbildung nahm. Vergleichbar dazu nahmen Peters und Conrad (1996) an, dass der Beginn der Methanbildung in Zusammenhang mit redox-aktiven Substanzen stand. Das Redoxpotential oder die Versorgung der methanogenen Mikroorganismen mit Substraten wurden auch in anderen Untersuchungen als limitierende Faktoren für die Methanogenese gesehen,

wenn alternative Elektronenakzeptoren zur Verfügung standen (Mayer und Conrad 1990, Segers und Kengen 1998, van Hulzen *et al.* 1999, Yao *et al.* 1999). Nach der Reduktion dieser Elektronenakzeptoren stieg die CH₄-Produktion an.

Ein Anstieg der Methanproduktion war hier in Phase III zu beobachten. Die sinkenden Konzentrationen von H₂ und Acetat zeigten, dass alle vorhandenen Substrate von den methanogenen *Archaea* genutzt werden konnten. Bis die Konzentration von Acetat auf niedrige, von da an konstante Werte gesunken war, war die Methanbildung demnach nicht limitiert.

Als weiterer für die Methanbildung entscheidender Faktor wurde auch die Biomasse und Aktivität der methanogenen *Archaea* selbst gesehen (Segers und Kengen 1998, van Hulzen *et al.* 1999). Eine geringe Methanbildung zu Beginn der Inkubation, wie hier in Phase II, wäre demnach auf eine kleine archaeelle Population zurückzuführen, die das durch die Strohzugabe gestiegene Substratangebot nicht ausnutzen konnte. Mit einer steigenden Anzahl der *Archaea* würde jedoch eine vollständige Nutzung der Substrate möglich, wodurch die methanogene Aktivität anstiege, wie hier in Phase III. Im Gegensatz zu dieser Annahme konnten Schütz *et al.* (1989) und Mayer und Conrad (1990) jedoch keine Zunahme der Anzahl methanogener *Archaea* bei der Inkubation von Reisfeldboden beobachten. In der vorliegenden Arbeit wurden die *Archaea* nicht quantifiziert, so dass keine Aussage darüber gemacht werden kann, ob die Biomasse der *Archaea* im Vergleich der Phasen II und III zunahm. In einer anderen Versuchreihe wurden parallel zu den hier dargestellten Versuchen 7 und 28 Tage nach Beginn der Inkubation die RNA-Mengen als Maß für die mikrobielle Aktivität gemessen (Sabine Weber, persönliche Mitteilung). Die dort gewählten Zeitpunkte waren jedoch nicht geeignet, um einen Vergleich zwischen der Phase II mit niedriger CH₄-Bildung und der Phase III mit der höchsten CH₄-Produktion zu machen, da nach 7 Tagen die Phasen bereits ineinander übergingen. Weitere Messungen zu Zeitpunkten, die deutlich in Phase II und Phase III lagen, wären daher nötig. Nach 7 und 28 Tagen war kein Unterschied zwischen den RNA-Mengen zu verzeichnen. Eine Zunahme hätte auf eine steigende Anzahl und Aktivität der *Archaea* hingedeutet. Inwieweit die Biomasse der methanogenen *Archaea* entscheidend für eine limitierte Methanproduktion war, konnte also mit den bisher durchgeführten Versuchen nicht geklärt werden.

In Phase IV wurde keines der Zwischenprodukte des anaeroben Abbaus angehäuft, sondern allein das Endprodukt CH₄, d. h. es konnten alle im ersten Schritt freigesetzten Substrate vollständig zu CH₄ und CO₂ abgebaut werden. Limitierend für die CH₄-Produktion war hier der erste Schritt des Abbaus, die Hydrolyse der Poly-

saccharide. Dieser Schritt galt bisher allgemein als der limitierende Schritt des Abbaus von organischem Material (Billen 1982, King 1986, Boschker *et al.* 1995, Yao *et al.* 1999). Auch im Reisfeldboden wurde beobachtet, dass die CH₄-Produktion durch die Substratverfügbarkeit bestimmt wurde (Joulian *et al.* 1997, Yao *et al.* 1999). Diese Beobachtungen wurden jedoch gemacht, wenn die Methanbildung schon konstant war, was hier Phase IV entsprach. Der Vergleich der potentiellen und der aktuellen hydrolytischen Aktivität hatte, wie in Kapitel 4-2 beschrieben, gezeigt, dass bei der Bereitstellung des Substrates für den weiteren Abbau vermutlich die Zugänglichkeit der Polymere für die Enzyme, die mit der Zeit abnahm, der limitierende Faktor war.

Die Phasen mit den unterschiedlichen limitierenden Schritten stimmten mit den drei Phasen der Methanbildung überein (vergleiche Kapitel 4.1), wobei die Phasen I und II zu der Phase mit niedriger Methanbildung, der sogenannten Reduktionsphase, zusammengefasst sind. Diese drei Phasen mit unterschiedlicher Produktion von CH₄ und Intermediaten des anaeroben Abbaus wurden schon häufiger beobachtet (Segers und Kengen 1998, van Hulzen *et al.* 1999, Yao und Conrad 1999, Yao *et al.* 1999). Dabei wurde jedoch nur bei van Hulzen *et al.* (1999) zwischen unterschiedlichen limitierenden Schritten des anaeroben Abbaus unterschieden. In den drei Phasen, in die die Methanbildung dort unterteilt wurde, waren erstens die Konkurrenz um H₂ oder Acetat mit Mikroorganismen, die alternative Elektronenakzeptoren reduzieren, zweitens das Wachstums der methanogenen *Archaea* und drittens die Bereitstellung von verwertbarem organischem Material entscheidend. Diese Unterteilung von van Hulzen *et al.* (1999) entspricht den in dieser Arbeit beobachteten Phasen II bis IV.

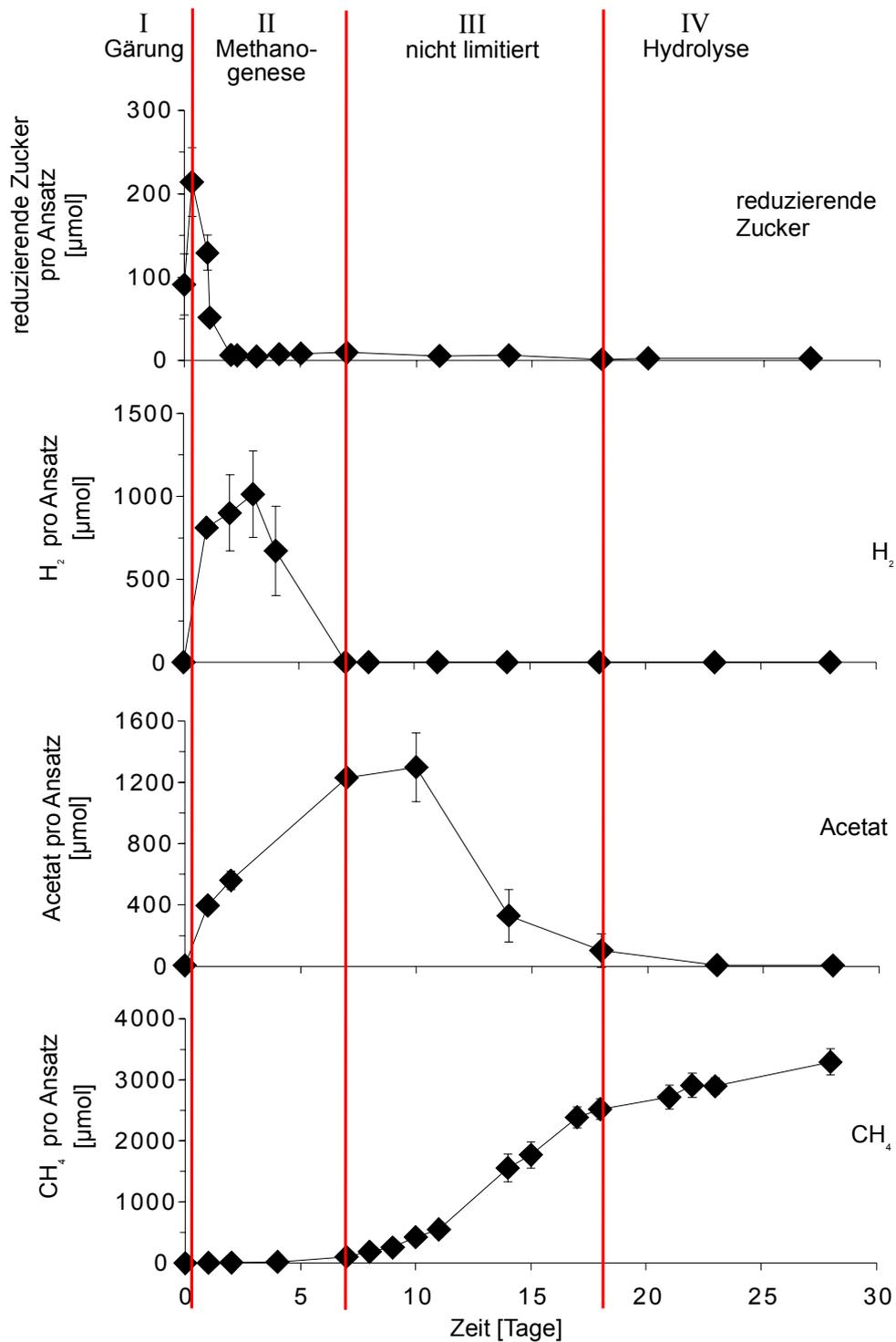


Abbildung 4-1: Limitierende Faktoren bei der Methanbildung dargestellt anhand der Konzentrationen von reduzierenden Zuckern, H_2 , Acetat und CH_4 (Angaben beziehen sich auf 40 g Reisfeldboden und 0,5 g Reisstroh vom Stiel pro Ansatz).

- Limitierend in Phase I: Vergärung von Monosacchariden
 Phase II: methanogene Aktivität
 Phase III: nicht limitiert
 Phase IV: Freisetzung von Monosacchariden

In den hier dargestellten Versuchen dienten Ansätze mit Reisfeldboden und Reisstroh in geschlossenen Gefäßen, die unter definierten Bedingungen inkubiert wurden, als Modellsystem (siehe Kapitel 2.2). Dabei konnten nicht alle Faktoren, die die CH_4 -Bildung unter natürlichen Bedingungen beeinflussen, berücksichtigt werden. So hat z. B. die Temperatur Einfluss auf die Abbauprozesse (Chin und Conrad 1995). Unter natürlichen Bedingungen ändert sich die Temperatur je nach Tages- und Jahreszeit und mit ihr die CH_4 -Emission (Schütz *et al.* 1985). Die Wasserversorgung von Reisfeldern kann zudem auch nach der Zugabe von Reisstroh wieder unterbrochen werden, z. B. um Dünger oder Pestizide in die Felder einzubringen (Krüger *et al.* 2000). In diesem Fall können durch Oxidationsprozesse wieder alternative Reduktionsäquivalente zur Verfügung gestellt werden, so dass ähnliche Bedingungen wie zu Anfang des Abbaus des Reisstrohs (Phase II) herrschen. Um alle Faktoren einbeziehen zu können, wären weitere, ergänzende Experimente notwendig.

Zusammenfassend kann man sagen, dass es hier während des anaeroben Abbaus von Reisstroh vier Phasen gab, in denen unterschiedliche Abbauschritte für die Methanbildung limitierend waren. In Phase I (< 1 Tag) war der limitierende Schritt die Fermentation der durch Hydrolyse freigesetzten Zuckermonomere und in Phase II (bis Tag 7) die Methanogenese selbst, wobei die Anwesenheit alternativer Elektronenakzeptoren wahrscheinlich eine entscheidende Rolle spielte. In Phase III (bis Tag 17) war die Methanbildung nicht limitiert. In Phase IV (ab Tag 17) wurde die Methanbildung durch die Hydrolyse der Polysaccharide begrenzt. Die Hydrolyse selbst wurde dabei vermutlich durch die Verfügbarkeit der Substrate für die Enzyme eingeschränkt.

4.4 Lokalisierung der Abbauprozesse

In dieser Arbeit wurde unter anderem untersucht, ob die Prozesse, die am anaeroben Abbau des Reisstrohs beteiligt waren, unterschiedlich auf die Kompartimente Reisfeldboden und Reisstroh verteilt waren. Einbezogen wurden die Hydrolyse der Polysaccharide, die Bildung von Fettsäuren als Intermediate des Abbaus und die Bildung des Endproduktes CH_4 (Abbildung 1-1). Diese Untersuchungen stellten eine sinnvolle Ergänzung zu den molekularbiologischen Experimenten dar, die parallel zu dieser Arbeit durchgeführt wurden und Aufschluss darüber geben sollten, welche Mikroorganismen sich am Stroh ansiedelten, aber nicht darüber, an welchen Prozessen diese Organismen beteiligt waren (Weber *et al.*, Manuskript in Vorbereitung). Die Besiedlung von organischem Material unter anaeroben Bedingungen wurde auch

schon früher untersucht, die Prozesse, für die die gefundenen Mikroorganismen verantwortlich waren, blieben dabei aber unberücksichtigt (Murakami *et al.* 1990, Saito *et al.* 1990, Bae *et al.* 1997, Kimura und Tun 1999).

Um eine Aufteilung der Prozesse auf die verschiedenen Kompartimente untersuchen zu können, mussten Stroh und Boden nach einer gemeinsamen Inkubation getrennt werden. Um die Trennung zu erleichtern, wurde das Stroh in Gazesäckchen eingegährt. Die Gazesäckchen hatten weder einen Einfluss auf die Bildung von H_2 , CO_2 oder CH_4 (Abbildung 3-1) noch auf die bakterielle Gemeinschaft, die das Stroh besiedelte (Sabine Weber, persönliche Mitteilung). Diese Methode wurde auch schon in anderen Versuchen zum mikrobiellen Abbau von organischem Material verwendet (Bae *et al.* 1997). Während der Boden nach Entfernen des Strohs wie zuvor weiter inkubiert werden konnte, musste das Stroh in Puffer gegeben werden. Verwendet wurde ein Phosphatpuffer mit Natriumcarbonat unter einer Stickstoff/Kohlendioxid Atmosphäre. Diese Kombination wurde in unterschiedlichen Konzentrationen für die Kultivierung von Methanogenen, anaeroben Bakterien und Homoacetogenen verwendet (Balch und Wolfe 1976, Balch *et al.* 1979, Tanner und Wolfe 1988, Stams *et al.* 1993, Schink 1994, Tanner 1997). Mit dem hier verwendeten Puffer konnte der pH-Wert trotz der sich ansammelnden Fettsäuren auf ungefähr pH 7 gehalten werden (Tabelle 3-8). Der pH-Wert lag damit nur geringfügig über dem der Kontroll- und Bodenansätze. Eine Hemmung der Methanogenese durch Phosphat, wie von Conrad *et al.* (2000) beobachtet, konnte hier ausgeschlossen werden, da die Phosphatkonzentration unter 10 mM lag. So war es möglich, die Abbauprozesse am Stroh getrennt vom Boden zu verfolgen.

Die CH_4 -Produktion in den Strohansätzen war trotz der guten Bedingungen für die methanogenen *Archaea* im Puffer gering, unabhängig davon, wann Boden und Stroh getrennt wurden (Abbildung 3-20 bis 3-22). Während die methanogene Aktivität gering war, zeigte sich eine hohe fermentative Aktivität in diesen Ansätzen, da Acetat, Propionat und andere Gärungsprodukte angehäuften wurden. Wie sich schon während der Inkubation von Stroh in Boden gezeigt hatte (siehe Kapitel 4-1) waren Acetat und Propionat die wichtigsten akkumulierenden Fettsäuren, während sich andere Gärungsprodukte nur in sehr geringen Konzentrationen anhäuften (Abbildung 3-20 bis 3-22). Dass sich H_2 nicht ansammelte, obwohl die Methanbildung sehr gering war, deutet darauf hin, dass auch syntrophe, H_2 -produzierende Mikroorganismen am Stroh nicht sehr aktiv waren. Im Boden waren die Aktivitäten anders als in den Ansätzen mit Stroh. Hier akkumulierten keine Fettsäuren, es wurde aber deutlich mehr Methan gebildet. Wasserstoff sammelte sich wie in den Strohansätzen nicht an. Bei einer

Trennung nach 7 Tagen sank die CH₄-Produktion auf eine sehr geringe Rate, nachdem die Fettsäuren kaum noch nachzuweisen waren (Abbildung 3-20). In den anderen Versuchen, in denen die Trennung zu anderen Zeitpunkten erfolgte, blieb die Konzentration der Fettsäuren wie in den Kontrollen konstant, ebenso wie die Bildung von Methan (Abbildung 3-21 und 3-22). Beides deutet darauf hin, dass die Menge an produziertem CH₄ nur durch die Verfügbarkeit von Substraten und nicht durch eine zu geringe potentielle methanogene Aktivität begrenzt wurde. Berechnet man zusätzlich zu dem CH₄, das in den Boden- und Strohanätzen gebildet wurde, das CH₄, das aus den in den Strohanätzen angesammelten Fettsäuren gebildet werden könnte, so ergänzen sich diese CH₄-Mengen zu dem CH₄, das in den Kontrollen gebildet wurde (Abbildung 3-24). Das CH₄, das aus diesen Intermediaten gebildet werden konnte, trug dabei am meisten zur CH₄-Bildung bei. Am Stroh konnten diese Intermediate nicht zu CH₄ umgesetzt werden und den Mikroorganismen im Boden standen sie nach der Trennung von Boden und Stroh nicht mehr zur Verfügung. Offensichtlich hing die CH₄-Produktion in den Kontrollen davon ab, dass die Fettsäuren, die von den Mikroorganismen am Stroh gebildet wurden, von den Organismen im Boden weiter umgesetzt wurden.

Die aktuelle hydrolytische Aktivität war am Stroh höher als im Boden (Abbildung 3-27). Dies war zu erwarten, da sich Cellulasen und Hemicellulasen an ihr Substrat anlagern, um es spalten zu können. Cellulasen binden z. B. in Form von multifunktionalen Proteinkomplexen, den sogenannten Cellulosomen, an Cellulose, wie es für *Clostridium thermocellum* gezeigt wurde (Bayer *et al.* 1996). Die höhere potentielle Aktivität war aber im Widerspruch dazu im Boden messbar (Abbildung 3-25). Auch eine zusätzliche Inkubation des Strohs nach der Trennung, durch die eine Produktion weiterer Enzyme möglich gewesen wäre, änderte daran nichts (Abbildung 3-26). Da die Summe der Aktivitäten in den getrennten Ansätzen nicht geringer war als in den Kontrollen, kann auch das Abwaschen der Enzyme vom Stroh ausgeschlossen werden (Tabelle 3-10). Bei der Bestimmung der potentiellen Aktivität blieb die Substratverfügbarkeit unberücksichtigt, wie bereits in Kapitel 4-2 näher besprochen wurde. Die Substratverfügbarkeit war am Stroh wesentlich höher als im Boden. Daher war die tatsächliche Freisetzung der Zucker am Stroh höher, obwohl im Boden mehr Enzyme gebildet wurden. Ähnliche Ergebnisse wurden auch schon früher für die Enzymaktivität im Reisfeldboden und in Sedimenten beobachtet. Im Reisfeldboden waren 36 bis 45 % der Aktivität hydrolytischer Enzyme an organische Partikel gebunden, in den Sedimenten sogar 95 % (Kanazawa 1979, Hood 1991). Ob die Enzyme im Boden gebildet wurden und dann an das Stroh anlagerten oder ob sie von Mikroorganismen

produziert wurden, die selbst an das Stroh angelagert waren, konnte hier nicht unterschieden werden. Mit Hilfe molekularbiologischer Methoden wurden allerdings Bakterien am Stroh gefunden, die in der Lage sind, hydrolytische Enzyme zu bilden (Sabine Weber, persönliche Mitteilung). Außerdem binden über die Cellulosomen nicht nur die Cellulasen, sondern auch die Bakterien an das Substrat (Bayer *et al.* 1996). Wenn am Stroh cellulolytische Aktivität nachgewiesen werden kann, ist es daher wahrscheinlich, dass sich mit den Enzymen auch die Bakterien dort angesiedelt haben.

Die an der Produktion von CH_4 , H_2 und Intermediaten beteiligten Prozesse waren demnach folgendermaßen auf Stroh und Boden verteilt: Am Stroh fanden die Hydrolyse der Polysaccharide und die Fermentationsprozesse statt, im Boden die syntrophen und methanogenen Prozesse (Abbildung 4-2). Die Fermentationsprodukte, die im Kompartiment Stroh freigesetzt wurden, standen anschließend den Mikroorganismen im Kompartiment Boden zur Verfügung.

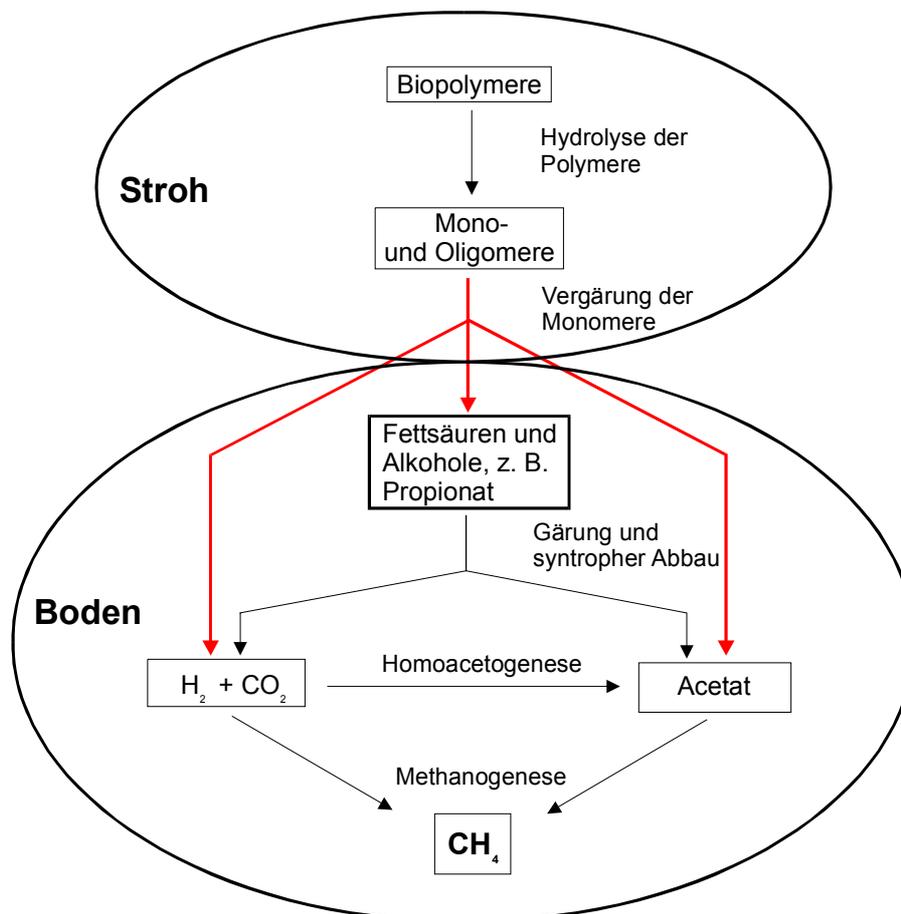


Abbildung 4-2: Lokalisierung der Prozesse, die am anaeroben Abbau von Reisstroh beteiligt waren, in den Kompartimenten Reisstroh (oberer Kreis) und Reisfeldboden (unterer Kreis). Rote Linien kennzeichnen den Transport der Gärungsprodukte vom Stroh in den Boden.

Die hier beobachtete Aufteilung der Abbauprozesse auf die verschiedenen Kompartimente widerspricht den Schlussfolgerungen von Saito *et al.* (1990), die davon ausgingen, dass die Mikroorganismen, die Cellulose in Reisfeldboden besiedelten, von der Umgebung unabhängig waren und das organische Material vollständig bis zur Bildung von CH_4 abbauen konnten. Ihre Experimente mit Cellulose, die nach verschiedenen Inkubationszeiten vom Boden getrennt wurde, beschränkten sich allerdings auf die Untersuchung der Produktion von CH_4 , H_2 und CO_2 . Außerdem wurde von ihnen nur die Cellulose untersucht, Vergleiche zu den Prozessen im Boden oder in Kontrollen wurden hingegen nicht gemacht. In der vorliegenden Arbeit wurden dagegen weitere Prozesse (Bildung von Intermediaten des Abbaus, Hydrolyse der Polysaccharide) in beiden Kompartimenten berücksichtigt, so dass ein weitaus komplexeres Bild von der räumlichen Aufteilung der Prozesse entstand (Abbildung 4-2).

Wie bereits weiter oben erwähnt waren die Prozesse im Boden substratlimitiert. Den hydrolytischen Enzymen stand nach dem Entfernen des Strohs kein Substrat zur Verfügung, und die Fettsäuren wurden nicht mehr vom Stroh in den Boden abgegeben. Zu erwarten gewesen wäre daher, dass die Konzentrationen der Fettsäuren absanken und die syntrophen und methanogenen Aktivitäten geringer wurden, wie es bei der Trennung nach 7 Tagen der Fall war (Abbildung 3-20). Bei der Trennung nach 30 bzw. 97 Tagen konnten aber geringe Konzentrationen der Fettsäuren im Porenwasser aufrecht erhalten werden (Abbildung 3-21 und 3-22). Hier stand offensichtlich eine Quelle zur Verfügung, aus der weiterhin kontinuierlich Fettsäuren freigesetzt wurden. Mikroskopische Untersuchungen des Porenwassers zeigten, dass sich nach ungefähr 60 Tagen im Porenwasser sehr kleine Strohstücke befanden, die dicht mit Mikroorganismen besiedelt waren (siehe Kapitel 3.3.1). Eine vollständige Trennung von Boden und Stroh war hier offensichtlich nicht mehr möglich, und die Versorgung der Bodenorganismen mit Fettsäuren fand in geringem Maße weiterhin statt.

Eine gemeinsame Besiedlung des Strohs durch alle Mikroorganismen, die am Abbau beteiligt sind, wäre theoretisch günstiger als die Verteilung auf Stroh und Boden. Am Reisstroh wurden auch schon tatsächlich gemischte Mikrokolonien beobachtet (Kimura und Tun 1999). Die räumliche Nähe würde den Stoffaustausch zwischen verschiedenen Organismengruppen erleichtern. Die parallelen Untersuchungen des Strohs mit molekularbiologischen Methoden zeigten, dass sich hauptsächlich Clostridien der Cluster I, III und XIVa am Stroh ansiedelten, die bekannt sind für die Hydrolyse von Zuckerpolymeren, Fermentationsprozesse oder Homoacetogenese (Weber *et al.*, Manuskript in Vorbereitung). Aber auch methanogene *Archaea*, wie *Methanosarcina*, *Methanobacterium* und Vertreter des rice cluster I, wurden gefunden (Weber 1998). Die

Methanogenen sind im Gegensatz zu den anderen Mikroorganismen aber offensichtlich nicht sehr aktiv. Ein Grund dafür könnte sein, dass das Stroh nach der Trennung gewaschen wurde, um Bodenpartikel zu entfernen. Mikroorganismen, die nicht fest an das Stroh gebunden waren, könnten dabei ebenfalls abgewaschen worden sein. Bei der Bildung von CH_4 und der potentiellen und aktuellen hydrolytischen Aktivität wurden jedoch, wenn überhaupt, nur geringfügige Aktivitätsverluste in den getrennten Ansätzen gegenüber den Kontrollen beobachtet (Abbildung 3-24, Tabelle 3-10 und 3-11). Die Inkubation des Puffers, mit dem das Stroh gewaschen wurde, zeigte außerdem, dass nur sehr wenig CH_4 gebildet wurde, obwohl Acetat und H_2 vorhanden waren (Abbildung 3-23). Methanogene *Archaea* wurden demnach offensichtlich kaum vom Stroh abgewaschen. Dagegen spricht auch, dass sie mit molekularbiologischen Mitteln detektiert wurden, nachdem das Stroh auf die gleiche Weise wie hier gewaschen worden war (Sabine Weber, persönliche Mitteilung).

Ein weiterer Grund für die Aufteilung der Prozesse könnte sein, dass die Freisetzung von Propionat, Acetat und H_2 in der unmittelbaren Umgebung der Bakterien, d. h. des Strohs, zu lokal begrenzten hohen Konzentrationen dieser Intermediate führte. In aquatischen Systemen wurde beobachtet, dass sich die H_2 -Konzentration in Mikronischen von der Umgebung unterscheiden konnte (Conrad 1996). Hohe Konzentrationen von Propionat und Acetat und anderen Fettsäuren würden dort zu einer Senkung des pH-Wertes führen, während im Boden der pH-Wert gut abgepuffert wurde. Methanogene *Archaea* sind aber nur in einem begrenzten, neutralen pH-Bereich aktiv (Garcia 1990). Eine lokale Senkung des pH-Wertes in der Umgebung der Methanogenen würde daher hemmend wirken und die methanogene Aktivität am Stroh einschränken, obwohl die hohen Acetatkonzentrationen die acetoklastische Methanogenese begünstigten, wie thermodynamische Berechnungen zeigten (Tabelle 3-9). Der Umsatz von Propionat wurde dagegen durch die schnell steigende Acetatkonzentration und die kurzzeitig hohen H_2 -Konzentrationen zwischenzeitlich thermodynamisch gehemmt (Tabelle 3-9), weil die Konzentration des Propionats selbst im Vergleich zu Acetat niedrig war (Conrad 1996). Die Experimente von Fukuzaki (1990) haben außerdem gezeigt, dass der syntrophe Abbau von Propionat durch hohe Acetat- und Propionatkonzentrationen wegen des Einflusses auf den pH-Wert gehemmt wurde. Auch eine lokal höhere H_2 -Konzentration kann hemmend auf den Propionatabbau wirken. In einigen aquatischen Systemen konnte ein Propionatabbau nur bei H_2 -Konzentrationen unter 10 nM stattfinden (Conrad *et al.* 1986).

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten, dass ein Zusammenspiel der Prozesse am Stroh und im Boden für den vollständigen Abbau des Strohs zu CH_4 nötig waren. Aber auch

für die Entwicklung der Mikroorganismengemeinschaft im Boden und am Stroh war der Einfluss des jeweils anderen Kompartimentes wichtig. Das zeigte der Vergleich zwischen Stroh, das nicht zuvor in Boden inkubiert wurde, mit dem, das vor der Trennung in Boden inkubiert wurde. Ohne den Einfluss von Boden wurde kein CH_4 in den Strohansätzen gebildet, während nach einer vorherigen Inkubation in Boden eine konstante, wenn auch geringe, CH_4 -Produktion zu beobachten war (Abbildung 3-19 bis 3-22). Dagegen akkumulierten höhere Mengen an Fettsäuren, wenn das Stroh nicht in Boden inkubiert wurde. Auch die molekularbiologischen Untersuchungen der Mikroorganismengemeinschaft am Stroh zeigten Unterschiede zwischen den Ansätzen bezüglich des 16S rDNA-Bandenmusters in einem denaturierenden Gradientengel (DGGE) (Weber et al., Manuskript in Vorbereitung). Das Stroh hatte ebenfalls einen Einfluss auf die Bodenorganismen, so stieg z. B. die potentielle Aktivität der hydrolytischen Enzyme im Boden durch die Zugabe von Stroh im Vergleich zum Boden ohne Stroh stark an (Abbildung 3-25). Dass sich die Mikroorganismengemeinschaft im Boden durch den Zusatz von organischem Material änderte, wurde auch bei verschiedenen anderen Untersuchungen beobachtet (Joulian *et al.* 1996, Asakawa 1998).

Eine Verteilung der Abbauprozesse auf die verschiedenen Kompartimente wurde, so weit bekannt, unter natürlichen Bedingungen bislang nicht beobachtet. Das gleiche Prinzip wurde jedoch bereits für die technische CH_4 -Produktion aus biologischem Abfall und Abwasser in zweiphasigen Reaktoren genutzt (Pohland und Gosh 1971, Cohen *et al.* 1979, Cohen *et al.* 1980, Thiele und Zeikus 1988). Hier wurden die Prozesse, in denen Fettsäuren produziert wurden, von den Prozessen, in denen die Fettsäuren verbraucht wurden, getrennt. Die Fettsäuren wurden von einem in den anderen Reaktor transportiert. Auf diese Weise sollte die Produkthemmung der Gärungsprozesse durch H_2 und die Hemmung der syntrophen und methanogenen Prozesse durch einen sinkenden pH-Wert verhindert werden (Thiele und Zeikus 1988, Grasius *et al.* 1997). Beides sind vermutlich Faktoren, die für die Aufteilung der Prozesse auf die Kompartimente Boden und Stroh verantwortlich sind (siehe oben). In Reaktoren, in denen die Prozesse nicht getrennt wurden, führten hohe Propionatkonzentrationen zu einer Hemmung des weiteren Abbaus (Cohen *et al.* 1980). In getrennten Systemen dagegen konnte die CH_4 -Produktion und der Prozentsatz an abgebautem organischem Material gesteigert werden (Cohen *et al.* 1980).

Die Zusammenfassung der Lokalisierung der Abbauprozesse ist in Abbildung 4-2 dargestellt. Das Stroh war der Hauptort der Hydrolyse der Biopolymere und der fermentativen Prozesse, während im Boden hauptsächlich die syntrophen und methanogenen Prozesse stattfanden. Ein vollständiger Abbau des Strohs konnte nur

durch die Kombination der Prozesse in beiden Kompartimenten erreicht werden. Die Verbindung zwischen den Kompartimenten waren die Fermentationsprodukte, die am Stroh gebildet wurden und danach im Porenwasser zur Verfügung standen. Die räumliche Aufteilung der Prozesse war unabhängig von der Zeit, in der Boden und Stroh gemeinsam inkubiert worden waren.

5 Literaturverzeichnis

- Acharya, C. N. (1935). Studies on the anaerobic decomposition of plant materials. I. The anaerobic decomposition of rice straw (*Oryza sativa*). *Biochem. J.* 29: 528-541
- Achtnich, C., F. Bak and R. Conrad (1995). Competition for electron acceptors among nitrate reducers, ferric iron reducers, sulfate reducers and methanogens in anoxic paddy soil. *Biol. Fertil. Soils* 19: 65-72
- Albert, D. B. and C. S. Martens (1997). Determination of low-molecular-weight organic acid concentrations in seawater and pore-water samples via HPLC. *Marine Chemistry* 56: 27-37
- Asakawa, S., M. Akagawa-Matsushita, Y. Koga and K. Hayano (1998). Communities of methanogenic bacteria in paddy field soils with long-term application of organic matter. *Soil Biol. Biochem.* 30 (3): 299-303
- Bae, H. D., T. A. Allister, E. G. Kokko, F. L. Leggett, L. J. Yanke, K. D. Jakober, J. K. Ha, H. T. Shin and K.-J. Cheng (1997). Effect on silica on the colonization of rice straw by ruminal bacteria. *Animal Feed Science Technology* 65: 165-181
- Balch, W. E. and R. S. Wolfe (1976). New Approach to the Cultivation of Methanogenic Bacteria: 2-Mercaptoethanesulfonic Acid (HS-CoM)-Dependent Growth of *Methanobacterium ruminantium* in a Pressurized Atmosphere. *Applied and Environmental Microbiology* 32 (6): 781-791
- Balch, W. E., G. E. Fox, L. J. Magrum, C. R. Woese and R. S. Wolfe (1979). Methanogens: Reevaluation of a Unique Biological Group. *Microbiological Reviews*: 260-296
- Bayer, E. A., E. Morag, Y. Shoham, J. Tormo and R. Lamed (1996). The cellulosome: a cell surface organelle for the adhesion to and degradation of cellulose. In: *Bacterial Adhesion: Molecular and Ecological Diversity*. (M. Fletcher ed.). Wiley-Liss, New York: 155-182
- Benner, R., A. E. Maccubbin and R. E. Hodson (1984). Anaerobic biodegradation of the lignin and polysaccharide components of lignocellulose and synthetic lignin by sediment microflora. *Applied and Environmental Microbiology* 47: 998-1004

- Berry, D. F., A. J. Francis and J.-M. Bollag (1987). Microbial Metabolism of Homocyclic and Heterocyclic Aromatic Compounds under Anaerobic Conditions. *Microbiological Reviews* 51(1): 43-59
- Billen, G. (1982). Modelling the processes of organic matter degradation and nutrients recycling in sedimentary systems. In: *Sediment microbiology*. (D. B. Nedwell and C. M. Brown eds.). Academic Press, New York: 15-52
- Boschker, H. T. S. and T. E. Cappenberg (1994). A Sensitive Method Using 4-methylumbelliferyl- β -Cellobiose as a Substrate to measure (1,4)- β -Glucanase Activity in Sediments. *Applied and Environmental Microbiology* 60: 3592-3596
- Boschker, H. T. S., S. A. Bertilsson, E. M. J. Dekkers and T. E. Cappenberg (1995). An Inhibitor-Based Method to Measure Initial Decomposition of Naturally Occurring Polysaccharides in Sediments. *Applied and Environmental Microbiology* 61: 2186-2192
- Burke, L. M. and D. A. Lashof (1990). Greenhouse gas emissions related to agriculture and land-use practices. In: *Impact of Carbon Dioxide, Trace Gases, and Climate Change on Global Agriculture*. (B. A. Rosenberg, N. J. Kimball, L. H. Allen, G. H. Heichel, C. W. Stuber, D. E. Kissel and S. Ernst eds.) . American Society of Agronomy, Madison, Wi.: 27-43
- Chidthaisong, A., K. Inubushi and Y. Muramatsu (1996). Production Potential and Emission of Methane in Flooded Rice Soil Microcosms after Continuous Application of Straws. *Microbes and Environments* 11 (3): 73-78
- Chidthaisong, A. and I. Watanabe (1997). Methane formation and emission from flooded rice soil incorporated with ^{13}C -labeled rice straw. *Soil Biol Biochem* 29 (8): 1173-1181
- Chidthaisong, A., H. Obata and I. Watanabe (1999a). Methane formation and substrate utilization in anaerobic rice soils as affected by fertilisation. *Soil Biology and Biochemistry* 31: 135-143
- Chidthaisong, A., B. Rosenstock and R. Conrad (1999b). Measurement of Monosaccharides and Conversion of Glucose to Acetate in Anoxic Rice Field Soil. *Applied and Environmental Microbiology* 65 (6): 2350-2355
- Chidthaisong, A. and R. Conrad (1999). 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.*, submitted

- Chidthaisong, A. and R. Conrad (2000). Pattern of non-methanogenic and methanogenic degradation of cellulose in anoxic rice field soil. *FEMS Microbiology and Ecology* 31: 87-94
- Chin, K.-J. and R. Conrad (1995). Intermediary metabolism in methanogenic paddy soil and the influence of temperature. *FEMS Microbiology Ecology* 18: 85-102
- Chin, K.-J., F. A. Rainey, P. H. Janssen and R. Conrad (1998). Methanogenic degradation of polysaccharides and the characterization of polysaccharolytic clostridia from anoxic rice field soil. *Syst. Appl. Microbiol.* 21: 185-200
- Christiansen and Hancke (1993). *BLV Bestimmungsbuch Gräser - Süßgräser, Sauergräser*, Binsens. 4. Auflage. BLV, München, Wien, Zürich
- Cicerone, R. J. and R. S. Oremland (1988). Biogeochemical aspects of atmospheric methane. *Global Biogeochemical Cycles* 2: 299-327
- Cicerone, R. J., C. C. Delwiche, S. C. Tyler and P. R. Zimmermann (1992). Methane emissions from California rice paddies with varied treatments. *Global Biogeochem. Cycles* 6: 233-248
- Cohen, A., R. J. Zoetemeyer, A. v. Deursen and J. G. v. Andel (1979). Anaerobic digestion of glucose with separated acid production and methane formation. *Water Research* 13: 571-580
- Cohen, A., A. M. Breure, J. G. v. Andel and A. v. Deursen (1980). Influence of phase separation on the anaerobic digestion of glucose - I. maximum COD-turnover rate during continuous operation. *Water Research* 14: 1439-1448
- Colberg, P. J. (1988). Anaerobic microbial degradation of cellulose, lignin, oligolignols, and monoaromatic lignin derivatives. In: *Biology of Anaerobic Microorganisms*. (A. J. B. Zehnder ed.). Wiley, New York: 333-372
- Conrad, R., B. Schink and T. J. Phelps (1986). Thermodynamics of H₂-producing and H₂-consuming metabolic reactions in diverse methanogenic environments under in-situ conditions. *FEMS Microbiology Ecology* 38: 353-360
- Conrad, R., F. S. Lupton and J. G. Zeikus (1987). Hydrogen metabolism and sulfate-dependent inhibition of methanogenesis in a eutrophic lake sediment (Lake Mendota). *FEMS Microbiol. Ecol.* 45: 107-115
- Conrad, R. and H. Schütz (1988). Methods of Studying Methanogenic Bacteria and Methanogenic Activities in Aquatic Environments. In: *Methods in Aquatic Bacteriology*. (B. Austin ed.). John Wiley and Sons, Chichester: 301-343

- Conrad, R. and B. Wetter (1990). Influence of temperature on energetics of hydrogen metabolism in homoacetogenic, methanogenic, and other anaerobic bacteria. *Arch. Microbiol* 155: 94-98
- Conrad, R. (1993). Mechanisms Controlling Methane Emission from Wetland Rice Fields. In: *The Biogeochemistry of Global Change. Radiative Trace Gases.* (R. G. Prinn ed.). Chapman and Hall, New York: 266-284
- Conrad, R. (1996). Anaerobic hydrogen metabolism in aquatic sediments. *Mitt. Internat. Verein Limnol.* 25: 15-24
- Conrad, R. (1999). Contribution of hydrogen to methane production and control of hydrogen concentrations in methanogenic soils and sediments. *FEMS Microbiology Ecology* 28: 193-202
- Conrad, R., M. Klose and P. Claus (2000). Phosphate Inhibits Acetotrophic Methanogenesis on Rice Roots. *Applied and Environmental Microbiology* 66 (2): 828-831
- Dannenberg, S. and R. Conrad (1999). Effect of rice plants on methane production and rhizosphere metabolism in paddy soil. *Biogeochemistry* 45: 53-71
- Delwiche, C. C. and R. J. Cicerone (1993). Factors affecting methane production under rice. *Global Biogeochemical Cycles* 7 (1): 143-155
- Denier van der Gon, H. A. C. and H. U. Neue (1995). Influence of organic matter incorporation on the methane emission from a wetland rice field. *Global Biochem. Cycles* 9: 11-22
- Fukuzaki, S., N. Nishio, M. Shobayashi and S. Nagai (1990). Inhibition of fermentation of propionate to methane by hydrogen, acetate and propionate. *Applied and Environmental Microbiology* 56: 719-723
- Garcia, J.-L. (1990). Taxonomy and ecology of methanogens. *FEMS Microbiol. Rev.* 87: 297-308
- Grant, R. F. (1998). Simulation of methanogenesis in the mathematical model Ecosys. *Soil Biol Biochem* 30 (7): 883-896
- Grasius, M. G., L. Iyengar and C. Venkobachar (1997). Anaerobic Biotechnology of the Treatment of Wastewaters: A Review. *Journal of Scientific and Industrial Research* 56: 385-397
- Hoehler, T. M., D. B. Albert, M. J. Alperin and C. S. Martens (1999). Acetogenesis from CO₂ in an anoxic marine sediment. *Limnol. Oceanogr.* 44: 662-667

- Holzappel-Pschorn, A., R. Conrad and W. Seiler (1986). Effects of vegetation on the emission of methane from submerged paddy soil. *Plant and Soil* 92: 223-233
- Holzappel-Pschorn, U. Obst and K. Haberer (1987). Sensitive methods for the determination of microbial activities in water samples using fluorogenic substrates. *Fresenius Z Anal Chem* 327: 521-523
- Hood, M. A. (1991). Comparison of four methods for measuring chitinase activity and the application of the 4 MUF assays in aquatic environments. *Journal of Microbiological Methods* 13: 151-160
- Huang, Y., R. L. Sass and F. M. J. Fisher (1998). A semi-empirical model of methane emission from flooded rice paddy soils. *Global Change Biology* 4 (3): 247-268
- IPCC (1994). Intergovernmental Panel of Climate Change 1994: Radiative Forcing of Climate Change and An Evaluation of the IPCC IS92 Emission Scenarios. J. T. Houghton, L. G. MeiraFilho, J. Bruce, H. Lee, B. A. Callander, E. Haites, N. Harris and K. Maskell. Cambridge University Press
- Joulian, C., B. Ollivier, H.-U. Neue and P. A. Roger (1996). Microbiological aspects of methane emission by a ricefield soil from the Camargue (France): 1. Methanogenesis and related microflora. *Eur. J. Soil Biol.* 32 (2): 61-70
- Joulian, C., S. Escoffier, J. L. Mer, H.-U. Neue and P. A. Roger (1997). Populations and potential activities of methanogens and methanotrophs in rice fields: relations with soil properties. *Eur. J. Soil Biol.* 33: 105-116
- Kanazawa, S. (1979). Studies on the plant debris in rice paddy soils (part 2). *Soil Sci Plant Nutr.* 25: 71-80
- Kimura, M., Y. Miura, A. Watanabe, T. Katoh and H. Haraguchi (1991). Methane Emission from Paddy Field (Part 1). Effect of Fertilization, Growth Stage and Midsummer Drainage: Pot Experiment. *Environ Sci* 4 (4): 265-271
- Kimura, M. (1997). Sources of methane emitted from paddy fields. *Nutrient Cycling in Agroecosystems* 49: 153-161
- Kimura, M. and C. C. Tun (1999). Microscopic Observation of the Decomposition Process of Leaf Sheath of Rice Straw and Colonizing Microorganisms During the Cultivation Period of Paddy Rice. *Soil Sci. Plant Nutr.* 45: 427-437
- King, G. M. (1986). Characterization of β -glucosidase activity in Intertidal marine sediments. *Applied and Environmental Microbiology* 51 (2): 373-380

- Klüber, H. D. and R. Conrad (1998). Effects of nitrate, nitrite, NO and N₂O on methanogenesis and other processes in anoxic rice field soil. *FEMS Microbiology and Ecology* 25: 301-318
- Kondo, T., T. Watanabe, T. Oshita and T. Kimura (1998). Physico-chemical characteristics of soluble lignin fractions released from forage grasses by ruminant digestion. *JARQ - Japan Agricultural Research Quarterly* 32 (3): 187-195
- Krüger, M., P. Frenzel and R. Conrad (2000). Microbial processes influencing methane emission from rice fields. *Global Change Biology*, accepted
- Krumböck, M. and R. Conrad (1991). Metabolism of position-labelled glucose in anoxic methanogenic paddy soil and lake sediment. *FEMS Microbiology Ecology* 85: 247-256
- Krylova, N. I., P. H. Janssen and R. Conrad (1997). Turnover of propionate in methanogenic paddy soil. *FEMS Microbiology Ecology* 23: 107-117
- Leschine, S. B. (1995). Cellulose degradation in anaerobic environments. *Annu. Rev. Microbiol.* 49: 399-426
- Lever, M. (1973). Colorimetric and fluorometric carbohydrate determination with p-hydroxybenzoic acid hydrazide. *Biochemical Medicine* 7: 274-281
- Lueders, T. and M. Friedrich (2000). Archaeal Population Dynamics during Sequential Reduction Processes in Rice Field Soil. *Applied and Environmental Microbiology* 66 (7): 2732-2742
- Mayer, H. P. and R. Conrad (1990). Factors influencing the population of methanogenic bacteria and the initiation of methane production upon flooding of paddy soil. *FEMS Microbiol Ecol.* 73: 103-112
- Meyer-Reil, L.-A. (1981). Enzymatic decomposition of proteins and carbohydrates in marine sediments: methodology and field observations during spring. *Kieler Meeresforschung Sonderheft* 5: 311-317
- Minoda, T., M. Kimura and E. Wada (1996). Photosynthates as dominant source of CH₄ and CO₂ in soil water and CH₄ emitted to the atmosphere from paddy fields. *Journal of Geophysical Research* 101 (D15): 21091-21097
- Miyajima, T., E. Wada, Y. Hanba and P. Vijarnson (1997). Anaerobic Mineralization of Indegenous Organic Matters and Methanogenesis in Tropical Wetland Soils. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 61(17): 3739-3751

- Moran, M. A., R. Benner and R. E. Hodson (1989). Bacterial secondary production on vascular plant detritus: Relationship to detritus composition and degradation rate. *Applied and Environmental Microbiology* 55: 2178-2189
- Mosier, A. R. (1998). Soil processes and global change. *Biol Fertil Soils* 27: 221-229
- Murakami, H. (1990). Microbial Colonization and Decomposition Processes in Rice Rhizoplane II. Decomposition of Young and Old Roots. *Soil Sci Plant Nutr.* 36 (3): 441-450
- Murayama, S. (1984). Decomposition kinetics of straw saccharides and synthesis of microbial saccharides under field conditions. *J. Soil Science* 35: 231-242
- Neue, H. U. and H. W. Scharpenseel (1987). Decomposition pattern of ¹⁴C-labeled rice straw in anaerobic and submerged rice soils of the Philippines. *Sci. Total Environ* 62: 431-434
- Neue, H. U., P. Becker-Heidmann and H. W. Scharpenseel (1990). Organic matter dynamics, soil properties, and cultural practices in ricelands and their relationship to methane production. In: *Soils and the Greenhouse Effect.* (A. F. Bouwman ed.). John Wiley, New York: 457-466
- Neue, H. U. (1993). Methane emissions from rice fields. *Bioscience* 43: 466-473
- Neue, H. U., R. Wassmann, R. S. Lantin, M. Alberto, J. B. Aduna and A. M. Javellana (1996). Factors affecting methane emission from rice fields. *Atmospheric Environment* 30 (10-11): 1751-1754
- Oremland, R. S. and D. G. Capone (1988). Use of "Specific" Inhibitors in Biogeochemistry and Microbial Ecology. *Adv. Microb. Ecol.* 10: 285-383
- Oyediran, G., K. Adachi and T. Senboku (1996). Effect of application of rice straw and cellulose on methane emission and biological nitrogen fixation in a subtropical paddy field. 1. Methane emission, soil-ARA, and rice plant growth. *Soil Science and Plant Nutrition* 42 (4): 701-711
- Peters, V., P. H. Janssen and R. Conrad (1998). Efficiency of hydrogen utilization during unithrophic and mixotrophic growth of *Acetobacterium wodii* on hydrogen and lactate in chemostat. *FEMS Microbiol Ecol* 26: 317-324
- Pohland, F. G. and S. Ghosh (1971). Developments in anaerobic stabilization of organic wastes - the two phase concept. *Environmental Letters* 1(4): 255-266
- Prinn, R. G. (1994). Global atmospheric-biospheric Chemistry. In: *Global Atmospheric-Biospheric Chemistry.* (R. G. Prinn eds.) . Plenum, New York: 1-18

- Rath, A. K., S. R. Mohanty, S. Mishra, S. Kumaraswamy, B. Ramakrishnan and N. Sethunathan (1999). Methane production in unamended and rice-straw-amended soil at different moisture levels. *Biol Fertil Soils* 28 (145-149)
- Rothfuss, F. and R. Conrad (1993). Thermodynamics of methanogenic intermediary metabolism in littoral sediment of Lake Constance. *FEMS Microbiology Ecology* 12: 265-276
- Saito, M., H. Wada and Y. Takai (1990). Development of a microbial community on cellulose buried in waterlogged soil. *Biol Fertil Soils* 9: 301-305
- Saito, K., H. Muto, Y. Takizama and M. Kodama (1994). Concentrations of Various Elements and Inorganic Ions in Rice Straw and Ash. *Toxicological and Environmental Chemistry* 41: 15-20
- Sass, R. L., F. M. Fisher, P. A. Harcombe and F. T. Turner (1991). Mitigation of methane emissions from rice fields. Possible adverse effects of incorporated rice straw. *Glob. Biogeochem. Cycles* 5: 275-287
- Schink, B. (1992). Syntrophism among procaryotes. In: *The procaryotes*. (A. Balows, H. G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder and K. H. Schleifer eds.). Springer, New York. 1: 276-299
- Schink, B. (1994). Diversity, Ecology and Isolation of Acetogenic Bacteria. In: *Acetogenesis*. (H. L. Drake ed.). Chapman and Hall, New York: 220-
- Schulz, S. and R. Conrad (1996). Influence of temperature on pathways to methane production in the permanently cold profundal sediment of Lake Constance. *FEMS Microbiology Ecology* 20: 1-14
- Schütz, H., A. Holzappel-Pschorn, R. Conrad, H. Rennenberg and W. Seiler (1989a). A 3-year continuous record on the influence of daytime, season, and fertilizer treatment on methane emission rates from an Italian rice paddy. *J. Geophys. Res.* 94: 16405-16416
- Schütz, H., W. Seiler and R. Conrad (1989b). Processes involved in formation and emission of methane in rice paddies. *Biogeochemistry* 7: 33-53
- Schütz, H., W. Seiler and H. Rennenberg (1990). Soil and land use related sources and sinks of methane (CH₄) in the context of the global methane budget. In: *Soils and the Greenhouse Effect*. (A. F. Bouwman ed.) . John Wiley, New York: 269-285

- Seitz, H.-J., B. Schink and R. Conrad (1988). Thermodynamics of hydrogen metabolism in methanogenic cocultures degrading ethanol or lactate. *FEMS Microbiology Ecology* 55: 119-124
- Shen, H. S., D. B. Ni and F. Sundstol (1998). Studies on untreated and urea-treated rice straw from three cultivation seasons: 1. Physical and chemical measurements in straw and straw fractions. *Animal Feed Science and Technology* 73: 243-261
- Sinsabaugh, R. L., R. K. Antibus and A. E. Linkins (1991). An enzymatic approach to the analysis of microbial activity during plant litter decomposition. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 34: 43-54
- Sinsabaugh, R. L., D. L. Moorhead and A. E. Linkins (1994). The enzymatic basis of plant litter decomposition: emergence of an ecological process. *Applied Soil Ecology* 1: 97-111
- Stams, A. J. M., J. B. v. Dijk, C. Dijkema and C. M. Plugge (1993). Growth of syntrophic propionate-oxidizing bacteria with fumerate in the absence of methanogenic bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*: 1114-1119
- Stams, A. J. M. (1994). Metabolic interactions between anaerobic bacteria in methanogenic environments. *Antonie van Leeuwenhoek Int. J. Gen. Mol. Microbiol.* 66: 271-294
- Stemmer, M., M. H. Gerzabek and E. Kandeler (1999). Invertase and xylanase activity of bulk soil and particle-size fractions during maize straw decomposition. *Soil Biology and Biochemistry* 31: 9-18
- Stieb, M. and B. Schink (1986). Anaerobic degradation of isovalerate by a defined methanogenic coculture. *Arch. Microbiol.* 144: 291-295
- Stinson, J. A. and R. K. Ham (1995). Effect Of Lignin On The Anaerobic Decomposition Of Cellulose As Determined Through The Use Of A Biochemical Methane Potential Method. *Environmental Science & Technology* 29(9): 2305-2310
- Suh, J. I., M. Fukui, Y. Suwa, T. Yamagishi, Y. Urushigawa and T. Mori (1992). Analysis of substrates for methanogenesis in anaerobic sludges using specific inhibitors. *Water Science Techn*: 847-856
- Takai, Y. (1970). The mechanism of methane fermentation in flooded paddy soil. *Soil Sci. Plant Nutr.* 16: 138-244

- Tanner, R. S. and R. S. Wolfe (1988). Nutritional Requirements of *Methanomicrobium mobile*. Applied and Environmental Microbiology 54(3): 625-628
- Tanner, R. S. (1997). Cultivation of Bacteria and Fungi. In: Manual of Environmental Microbiology. (C. J. Hurst, G. R. Knudsen, M. J. McInerney, L. D. Stetzenbach and M. V. Walter eds.). ASM Press, Washington DC: 52-60
- Thauer, R. K., K. Jungermann and K. Dekker (1977). Energy Conservation in Chemotrophic Anaerobic Bacteria. Bacteriological Reviews 41 (1): 100-180
- Thebrath, B., H. P. Mayer and R. Conrad (1992). Bicarbonate-dependent production and methanogenic consumption of acetate in anoxic paddy soil. FEMS Microbiol. Ecol. 86: 295-302
- Thiele, J. H. and J. G. Zeikus (1988). The Anion-Exchange Substrate Shuttle Process: A New Approach to Two-Stage Biomethanation of Organic and Toxic Wastes. Biotechnology and Bioengineering 31: 521-535
- Tsutsuki, K. and F. N. Ponnamperna (1987). Behaviour of anaerobic decomposition products in submerged soils. Soil Sci Plant Nutr 33 (1): 13-33
- van Hulzen, J. B., R. Segers, P. M. v. Bodegom and P. A. Leffelaar (1999). Temperature effects on soil methane production: an explanation for observed variability. Soil Biology and Biochemistry 31: 1919-1929
- Villegas-Pangga, G., G. Blair and R. Lefroy (2000). Measurement of decomposition and associated nutrient release from straw (*Oryza sativa* L.) of different rice varieties using a perfusion system. Plant & Soil 223 (1-2): 1-11
- Watanabe, A., K. Kato and M. Kimura (1993). Effect of rice straw application on CH₄ emission from paddy fields. II. Contribution of organic constituents in rice straw. Soil Science and Plant Nutrition 39: 707-712
- Watanabe, A., Y. Satoh and K. Kimura (1995). Estimation of the increase in methane emission from paddy soils by rice straw application. Plant and Soil 173: 225-231
- Watanabe, A. and M. Kimura (1998). Effect of Rice Straw Application on CH₄ Emission from Paddy Fields. IV. Influence of Rice Straw Incorporated During the Previous Cropping Period. Soil Science and Plant Nutrition 44 (4): 507-512
- Watanabe, A., M. Yoshida and M. Kimura (1998). Contribution of rice straw carbon to CH₄ emission from rice paddies using ¹³C-enriched rice straw. Journal of Geophysical Research 103 (D7): 8237-8242

- Watanabe, A., T. Takeda and M. Kimura (1999). Evaluation of origins of CH₄ carbon emitted from rice paddies. *Journal of Geophysical Research* 104 (D19): 23623-23629
- Weber, S. (1998). Entwicklung methanogener Lebensgemeinschaften beim methanogenen Abbau von Reisstroh im Boden. Jahresbericht
- Weber, S., S. Stubner and R. Conrad (2000). Composition of rice straw degrading bacterial community in anoxic paddy soil. submitted to *Applied and Environmental Microbiology*
- Wood, W. A. and S. T. Kellogg (1988). Biomass; Part A Cellulose and Hemicellulose. In: *Methods in Enzymology*, Vol. 160 (J. N. Abelson and M. I. Simon, eds.). Academic Press, Inc., San Diego, New York, Berkeley, Boston, London, Sydney, Tokyo, Toronto.
- Wu, W.-M., M. K. Jain, R. F. Hickey and J. G. Zeikus (1996). Perturbation of Syntrophic Isobutyrae and Butyrate Degradation with Formate and Hydrogen. *Biotechnology and Bioengineering* 52: 404-411
- Yagi, K. and K. Minami (1990). Effect of Organic Matter Application on Methane Emission from Some Japanese Paddy Fields. *Soil Science Plant Nutrition* 36 (4): 599-610
- Yamane, I. and K. Sato (1964). Decomposition of glucose and gas formation in flooded soil. *Soil Sci. Plant Nutr.* 10: 35-41
- Yao, H. and R. Conrad (1999). Thermodynamics of methane production in different rice paddy soils from China, the Philippines and Italy. *Soil Biology and Biochemistry* 31: 463-473
- Yao, H., R. Conrad, R. Wassmann and H. U. Neue (1999). Effect of soil characteristics on sequential reduction and methane production in sixteen rice paddy soil from China, the Philippines, and Italy. *Biogeochemistry* 47: 269-295
- Zehnder, A. J. B. (1978). Ecology of methane formation. In: *Water Pollution Microbiology*. (R. Mitchell ed.). Wiley, New York. 2: 349-376
- Zehnder, A. J. B. and W. Stumm (1988). Geochemistry and biogeochemistry of anaerobic habitats. In: *Biology of anaerobic microorganisms*. (A. J. B. Zehnder ed.). Wiley, New York: 1-38

- Zeikus, J. G. (1980). Fate of lignin and related aromatic substrates in anaerobic environments. In: Lignin biodegradation: microbiology chemistry and potential applications. (T. K. Kirk, T. Higuchi and H.-M. Cheng eds.). CRC Press, Boca Raton, Fla: 101-109

Fermentation pattern of methanogenic degradation of rice straw in anoxic paddy soil

Kristin Glissmann, Ralf Conrad *

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

Received 13 August 1999; received in revised form 29 October 1999; accepted 29 October 1999

Abstract

The anaerobic degradation of different fractions of rice straw in anoxic paddy soil was investigated. Rice straw was divided up into stem, leaf sheath and leaf blade. The different straw fractions were mixed with paddy soil and incubated under anoxic conditions. Fermentation of straw components started immediately and resulted in transient accumulation of acetate, propionate, butyrate, isobutyrate, valerate, isovalerate and caproate with much higher concentrations in the presence than in the absence of straw. Also some unidentified compounds with UV absorption could be detected. The maximum concentrations of these compounds were different when using different straw fractions, suggesting differences in the degradation pathway of these straw fractions during the early phase of incubation, i.e. with Fe(III) and sulfate serving as oxidants. When concentrations of the intermediates decreased to background values, CH₄ production started. Rates of CH₄ production were higher in incubations with straw from the stem > leaf blade > leaf sheath > unamended soil. During the methanogenic phase, the percentage contribution of fermentation products to CH₄ production was determined by inhibition with 2-bromoethanesulfonate (BES). Acetate (48–83%) and propionate (18–28%) were found to be the main intermediates of the carbon flow to CH₄, irrespective of the fraction of the rice straw or its absence. Mass balance calculations showed that 84–89% of CH₄ was formed via acetate in the various incubations. Radiotracer experiments showed that 11–27% of CH₄ was formed from H₂/CO₂, thus confirming that acetate contributed 73–89% to methanogenesis. Our results show that the addition of rice straw and the fraction of the straw affected the fermentation pattern only in the early phase of degradation, but had no effect on the degradation pathway during the later methanogenic phase. © 2000 Federation of European Microbiological Societies. Published by Elsevier Science B.V. All rights reserved.

Keywords: Fermentation; Inhibition; Hydrogen; Acetate; Fatty acid; Thermodynamics; 2-Bromoethanesulfonate

1. Introduction

Rice fields are one of the major sources in the global methane budget and affect climate [1,2]. Therefore, the processes involved in CH₄ formation in rice fields are of great interest [3,4]. Methane is the product of anaerobic degradation of organic matter in the submerged soil. Studies using isotopically labelled rice straw and rice plants have shown that the produced CH₄ is derived from the degradation of rice straw, root exudates and soil organic matter [5–10]. Incorporation of rice straw into the soil as a fertilizer is a common practice in rice cultivation. Therefore, rice straw is one of the main carbon sources in paddy soil. It has frequently been demonstrated that incorporation of rice straw strongly enhances the emission of CH₄ from rice fields [11–18]. In fact, addition of organic mate-

rial to soil is considered as one of the most important factors influencing the source strength of rice fields for atmospheric CH₄ [19]. However, the pathway of anaerobic degradation of rice straw in the soil has not yet been investigated.

Rice straw consists of different biopolymers, including cellulose (32–37%), hemicellulose (29–37%) and lignin (5–15%) and, in addition, contains inorganic components such as silica [20–22]. The polysaccharides in the straw, in particular, may serve as substrates for the complex microbial community that degrades organic matter to CO₂ and CH₄. Although lignin should largely be recalcitrant in the absence of O₂ [23], some components of this relatively complex biopolymer seem to be degraded in anoxic sediments and result in the formation of CH₄ [24]. The methanogenic degradation pathway of dead organic matter is in principle well known and involves hydrolysis of organic polymers; fermentation of the resulting monomers to fatty acids, alcohols, CO₂ and H₂; syntrophic conversion of fatty acids and alcohols to acetate, CO₂ and H₂; homo-

* Corresponding author. Tel.: +49 (6421) 178 801;
Fax: +49 (6421) 178 809; E-mail: conrad@mail.uni-marburg.de

acetogenesis from H_2/CO_2 , sugars and other substrates and finally, conversion of H_2/CO_2 and acetate to CH_4 and CO_2 [3,25–27]. The processes and the functional groups of microorganisms involved in the anaerobic degradation of soil organic matter have been investigated in some detail in anoxic rice field soils [28–31]. There are also reports on the methanogenic degradation of defined carbohydrates such as glucose, cellulose, hemicellulose and pectin in rice field soils [32–38]. These investigations indicate that differences exist in the degradation pathways and fermentation patterns of the different carbohydrates. However, the degradation of straw itself has received only little attention [20]. Rice straw is more complex than cellulose or xylan and its composition is not homogeneous [22]. The stem, leaf sheath and leaf blade of rice consist of different proportions of the organic constituents. The different composition of rice straw fractions might result in different degradation patterns [21] and inorganic components may also influence degradation processes. Silica, for example, affects the colonization of organic matter by methanogens [39]. Therefore, investigation of the degradation process of complete rice straw is warranted.

The purpose of this study was to identify the intermediates formed during the degradation of rice straw in anoxic slurries of paddy soil. The straw was divided into stem, leaf sheath and leaf blade to investigate the effect of the differences in the composition on the degradation processes. The contribution of fermentation products to methanogenesis was determined after inhibition of CH_4 production by 2-bromoethanesulfonate (BES) [40]. The accumulation of the immediate methanogenic precursors (especially H_2) inhibits syntrophic degradation processes for thermodynamic reasons and thus results in the accumulation of the primary fermentation products [41]. The relative contribution of H_2/CO_2 and acetate to methanogenesis was measured by the incorporation of $^{14}CO_2$ into $^{14}CH_4$ [42].

2. Materials and methods

2.1. Soil and straw samples

Soil originated from rice fields at the Italian Rice Research Institute in Vercelli, Italy. The main characteristics of the soil have been described before [5]. The soil was used for growing rice in greenhouse experiments. After harvest and drainage, the soil was air-dried and stored as dry lumps at room temperature. The straw originated from rice plants (*Oryza sativa*, var. Roma) grown in the greenhouse. After harvest, the straw was air-dried and stored at room temperature. For each experiment, the straw was divided into three fractions: stem (stem straw), leaf sheath (sheath straw) and leaf blade (leaf straw). The different fractions of the straw were used in separate incubations.

2.2. Preparation and incubation of slurries

The soil was sieved through a stainless steel sieve (2-mm mesh). Glass bottles (150 ml; Müller and Krempel, Bülach, Switzerland) were filled with 40 g dry soil and 40 ml distilled autoclaved and degassed water. Rice straw (0.5 g), cut into pieces of 2–3 cm length, was added and bottles were closed with latex stoppers, evacuated and flushed with N_2 several times. The bottles were vigorously shaken by hand to homogenize the soil straw mixture. However, subsequent incubation at 25°C in the dark occurred without shaking (except when taking gas samples, see below) to avoid the potential destruction of microorganisms that are sensitive to mechanical forces [43]. Each experiment was carried out in triplicate.

2.3. Inhibition and tracer experiments

Inhibition experiments and radioactive experiments were done when methanogenesis had reached the steady state (after 28 days). Methanogenesis was inhibited by addition of 20 mM BES. For the radioactive experiments, $NaH^{14}CO_3$ (Amersham, Braunschweig, Germany) was added to a final radioactivity of about 1.5 μCi (5×10^4 Bq). Further incubation was at 25°C without shaking, except when taking gas samples. At this time, the dissolved and gaseous CO_2 and CH_4 were brought into equilibrium by heavy shaking.

2.4. Measurement of gases and dissolved compounds

Before taking gas and porewater samples, bottles were shaken vigorously to achieve equilibrium between the gas and liquid phase and then left standing so that the soil particles could settle. Gas samples (0.2 ml) were taken with a pressure-lock syringe. Porewater samples (1 ml) were taken with sterile syringes equipped with long needles. The porewater was transferred to Eppendorf tubes and centrifuged for 15 min at 13 000 rpm at 4°C. The supernatant was removed and stored at $-18^\circ C$ until analysis. Prior to analysis, the samples were filtered through 0.2- μm membrane filters (regenerated cellulose, Satorius, Göttingen, Germany).

Radioactive and non-radioactive CH_4 and CO_2 were analyzed in a gas chromatograph equipped with methanizer, flame ionization detector and gas proportional counter [44]. Hydrogen was analyzed in gas chromatographs equipped with a HgO -to- Hg conversion detector ($H_2 < 10$ Pa) or a thermal conductivity detector ($H_2 > 10$ Pa) [45]. Fatty acids and alcohols were analyzed by high pressure liquid chromatography (HPLC) [34]. The eluted compounds were detected with an UV detector at 205 nm and a refraction index detector. The concentrations of caproate and butyrate were additionally measured in a gas chromatograph equipped with a flame ionization detector and a FFAP column (30 m \times 0.32 mm; J&W Scien-

tific, Folsom, USA) with hydrogen, 65-kPa inlet pressure, as carrier gas. The liquid samples were diluted (1:2) with 0.2 M formic acid and 2 mM octane as internal standard and an aliquot (1 μ l) was injected via a splitter injection port (220°C) with a split ratio of 1:10. The temperatures of the column and the detector were 140 and 220°C, respectively.

2.5. Calculations

For mass balance calculations, the metabolites which accumulated in the inhibited incubations were compared to the CH_4 formed in the uninhibited control. The amounts of accumulated metabolites were calculated from the concentrations in the inhibited incubations minus those in the non-inhibited controls. Correspondingly, the CH_4 concentrations were calculated from the concentrations in the control minus those in the inhibited incubations. The amounts of accumulated metabolites were converted into equivalents of CH_4 according to the stoichiometry of the respective syntrophic pathway [28]. The equivalents of CH_4 were compared to the CH_4 which was formed in the control.

Gibbs free energies (ΔG) of the individual reactions were calculated from the standard Gibbs free energies (ΔG°) and the actual concentrations of reactants and products as described previously [28,41]. The standard Gibbs free energies (ΔG°) of the reactions were calculated from the standard Gibbs free energies of formation (G_f°) of the reactants and products using literature data [46–48].

The conversion of $\text{H}^{14}\text{CO}_3^-$ to $^{14}\text{CH}_4$ was used to determine the fraction (f_{H_2}) of CH_4 produced from H_2/CO_2 . The specific radioactivities (Bq mol^{-1}) of CH_4 (SR_{CH_4}) and CO_2 (SR_{CO_2}) were determined from the radioactive and non-radioactive CH_4 and CO_2 , respectively. The fractions (f_{H_2}) were calculated using $f_{\text{H}_2} = \text{SR}_{\text{CH}_4}/\text{SR}_{\text{CO}_2}$ [42,44].

3. Results

3.1. Effect of addition of rice straw

Addition of rice straw to paddy soil resulted in increased release of CH_4 , H_2 and CO_2 regardless of the fraction of rice straw used (Fig. 1). The H_2 partial pressures increased only transiently, stem straw giving the greatest increase. Within at most 7 days, the H_2 partial pressures decreased to about 1.5 Pa in the unamended soil and to 4.4–6.0 Pa in the incubations with straw (Fig. 1A). The partial pressures of CO_2 in the gas phase increased most rapidly within the first 4 days, then accumulated with constant rates of 12 $\mu\text{mol day}^{-1} \text{ bottle}^{-1}$ (soil only), 75 $\mu\text{mol day}^{-1} \text{ bottle}^{-1}$ (soil with stem straw), 38 $\mu\text{mol day}^{-1} \text{ bottle}^{-1}$ (soil with sheath straw) or 47 $\mu\text{mol day}^{-1} \text{ bottle}^{-1}$ (soil with leaf straw), respectively

(Fig. 1B). In the unamended soil, CH_4 accumulated after a short lag phase with a constant rate of about 10 $\mu\text{mol day}^{-1} \text{ bottle}^{-1}$ (Fig. 1C). In the straw-amended soil, the lag phase was followed by rapid CH_4 formation with rates of 82–306 $\mu\text{mol day}^{-1} \text{ bottle}^{-1}$, being highest in the incubations with stem straw (Fig. 1C). After day 17, CH_4 increased almost linearly during the remaining incubation period with rates of 83 $\mu\text{mol day}^{-1} \text{ bottle}^{-1}$ (stem straw), 42 $\mu\text{mol day}^{-1} \text{ bottle}^{-1}$ (sheath straw) and 77 $\mu\text{mol day}^{-1} \text{ bottle}^{-1}$ (leaf straw).

The following metabolites were detected during the incubation with straw: acetate, propionate, butyrate, caproate, isobutyrate, isovalerate and valerate. Fig. 2 shows the intermediate accumulation of these compounds during the incubations with stem straw. Similar accumulation patterns were obtained with the other fractions of the straw. After reaching a maximum, the metabolites decreased at about the time when the CH_4 production rate became constant (i.e. at 18–21 days) and then stayed at a low concentration. The maximum concentrations are summarized in Table 1. Acetate was always found in highest concentrations. However, the maximum concentrations of the metabolites were affected by the presence and type of straw added. Propionate was the second highest metabolite in incubations with sheath straw and leaf straw, while

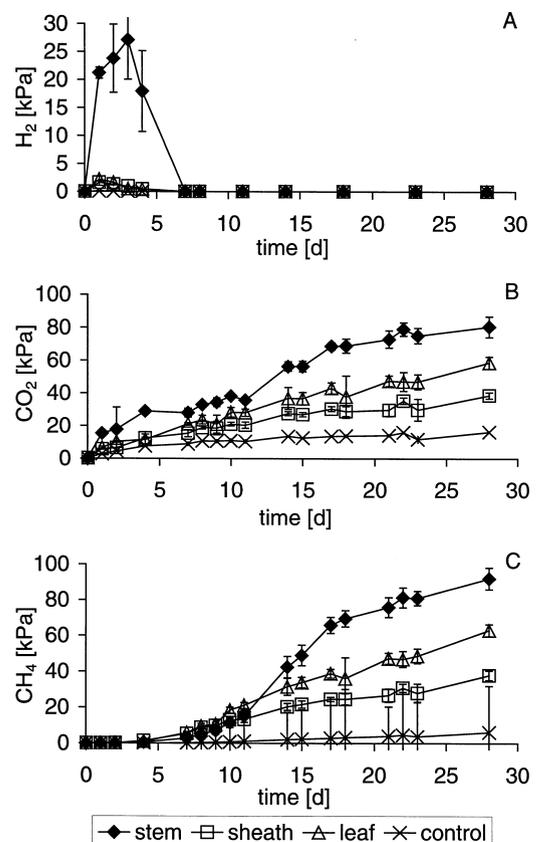


Fig. 1. Effect of the addition of different fractions of rice straw on production of (A) H_2 , (B) CO_2 and (C) CH_4 in comparison to unamended rice soil (bars = S.D., $n = 3$).

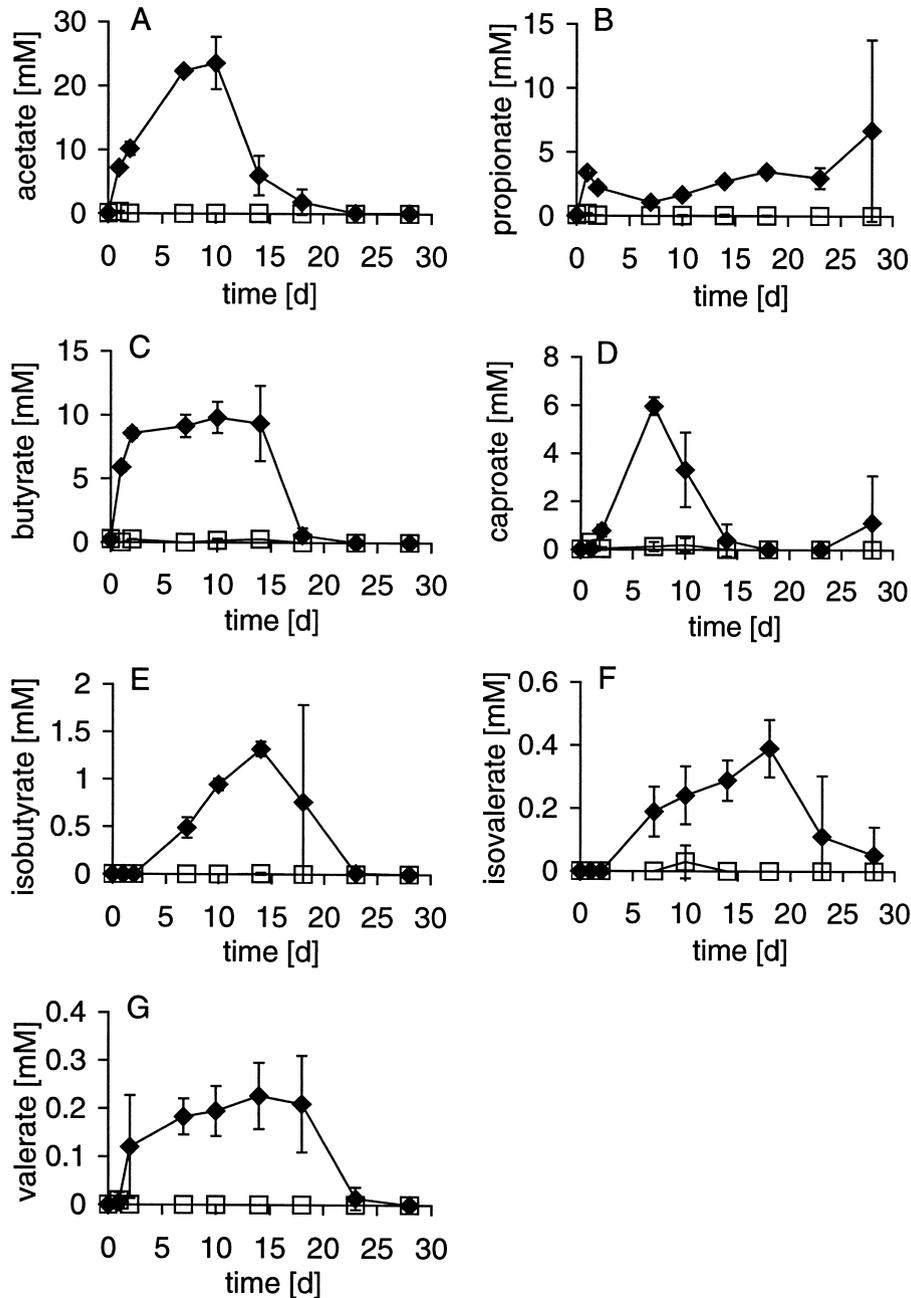


Fig. 2. Effect of the addition of rice straw from the stem (◆) on production of intermediates in comparison to unamended rice soil (□) (bars = S.D., $n = 3$).

butyrate was the second highest in the incubations with stem straw and in unamended soil. Caproate was the third highest intermediate with stem straw. In the unamended control soil, acetate, butyrate and propionate concentrations were lower than in straw-amended soils, valerate was just detectable and isobutyrate, isovalerate and caproate were not detectable at all (Table 1).

HPLC analysis of the straw incubations showed several unidentified peaks which were seen by the UV detector (data not shown). The peak areas increased and decreased during the incubation of rice straw in the soil slurry in a similar manner to the metabolites shown in Table 1. The

pH of all the incubations initially decreased to pH 5.3–5.7, with a further increase to pH 6.7–6.9 after 7–14 days.

3.2. Inhibition experiments

After reaching steady state, CH_4 production was inhibited by addition of BES (after 28 days). The effect of BES addition on the formation of CH_4 , CO_2 , H_2 (Fig. 3) and organic metabolites (Fig. 4) is only illustrated for the incubations with stem straw. Similar results were obtained with sheath straw and leaf straw (data not shown). As methanogenesis was completely inhibited by the addition

Table 1
Maximal concentrations of metabolites accumulating during the degradation of different straw fractions in anoxic Italian paddy soil

Metabolite	Maximal concentration during the first 28 days (mM)			
	Stem ^a	Leaf sheath	Leaf blade	Soil only ^a
Acetate	23.6	4.1	9.3	0.25
Propionate	3.4	3.2	4.3	0.18
Isobutyrate	1.3	0.04	0.1	< 0.01
Butyrate	9.8	0.5	0.8	0.3
Isovalerate	0.4	0.03	0.1	< 0.01
Valerate	0.2	0.1	0.03	0.01
Caproate	6.0	1.7	1.7	< 0.01

^aData shown in Fig. 2.

of BES (Fig. 3C), H₂ accumulated with a rate of about 1 μmol day⁻¹ bottle⁻¹ (Fig. 3A). In unamended soil, H₂ accumulated with a rate of only about 0.01 μmol day⁻¹ bottle⁻¹. The addition of BES had almost no effect on the production of CO₂ (Fig. 3B). The pH remained constant between 6.7 and 6.9 during the whole experiment.

Inhibition of methanogenesis resulted in accumulation of the following intermediates irrespectively of which fraction of straw was added: acetate, propionate, butyrate, isobutyrate, isovalerate and valerate (Fig. 4), but valerate was not detected in incubations with leaf straw. Valerate accumulated with a lag time of 9 days (Fig. 4). Interestingly, caproate did not accumulate upon inhibition with BES, although it was initially detected during the uninhibited incubation of the first 28 days, especially with stem straw (Table 1). Similarly, butyrate did not accumulate in BES-inhibited unamended soil, although it was initially detected. In unamended soil, only acetate and propionate accumulated (data not shown). Table 2 summarizes the amounts of the metabolites that had accumulated 21 days after addition of BES for all incubations. Acetate was the most important intermediate, followed by propionate, whereas all the other metabolites were detected in much lower concentrations.

3.3. Mass balance calculations

The amounts of intermediary metabolites which accumulated in the absence of methanogenesis were balanced against the CH₄ that was produced in the uninhibited control. Again, only the values for the incubation with stem straw are given as example in Fig. 5 and other incubations showed a similar pattern. Constant balance was reached 11 days after inhibition by BES (Table 2). The accumulated acetate accounted for 48.2–83.5% of the CH₄, showing that it was the most important intermediate. Propionate was next highest accounting for 18.2–27.7%. All other intermediates accounted for only small percentages of the CH₄ formation. About 80–110% of the CH₄ missing due to inhibition was recovered in the accumulated intermediates (Fig. 5, Table 2). A comparison of the CH₄ formed from all intermediates and the CH₄ which

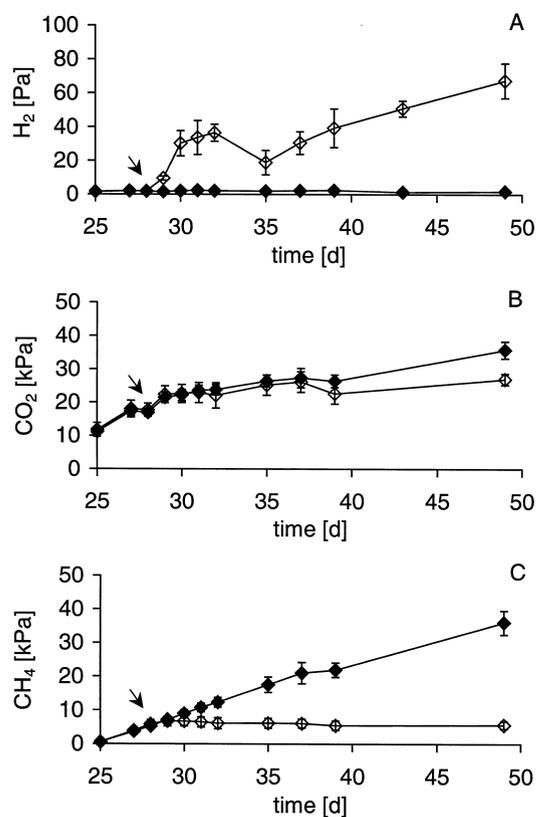


Fig. 3. Temporal change of production of (A) H₂, (B) CO₂ and (C) CH₄ during steady state methanogenesis in rice field soil amended with stem straw in the absence (◆) and the presence (◇) of BES. Arrows indicate addition of BES (bars = S.D., n = 3).

can be formed via the equivalents of acetate and H₂ shows that 84–89% of CH₄ was formed via acetate in the various incubations, whether straw was added or not and irrespectively of the fraction of straw added.

3.4. Thermodynamic calculations

The concentrations of organic metabolites and partial pressures of H₂, CH₄ and CO₂ that were measured in incubations with stem straw (as an example) were used to calculate the Gibbs free energies (ΔG) of various reactions under uninhibited and BES-inhibited conditions. Methanogenesis was clearly exergonic: ΔG of CH₄ formation from H₂/CO₂ was -23 – -26 kJ mol⁻¹ CH₄ and ΔG of CH₄ formation from acetate was -18 – -26 kJ mol⁻¹ CH₄. Homoacetogenesis from H₂/CO₂ was only slightly exergonic ($\Delta G = -6$ – 0 kJ mol⁻¹ acetate) in the uninhibited control, but became more exergonic after addition of BES ($\Delta G = -3$ – -23 kJ mol⁻¹ acetate). Syntrophic propionate degradation to acetate, CO₂ and H₂ was exergonic in the control ($\Delta G = -15$ – -25 kJ mol⁻¹ propionate), but became endergonic upon addition of BES ($\Delta G = +4$ – $+16$ kJ mol⁻¹ propionate). Syntrophic degradation of butyrate, isobutyrate, valerate and isovalerate also became endergonic upon addition of BES ($\Delta G > +5$ kJ mol⁻¹ substrate).

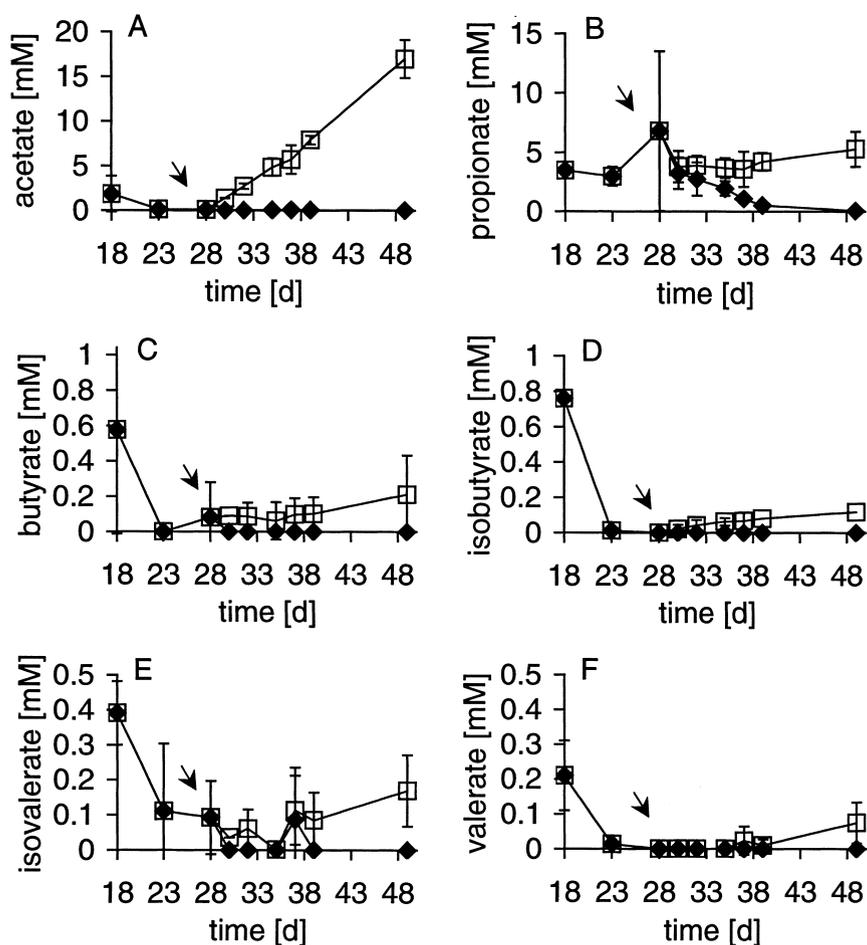


Fig. 4. Temporal changes in production of different intermediates during steady state methanogenesis in rice field soil amended with stem in the absence (◆) and presence (□) of BES. Arrows indicate addition of BES (bars=S.D., $n=3$).

3.5. Radiotracer experiments

The fraction (f_{H_2}) of CH_4 produced from H_2/CO_2 was determined in unamended soil and straw-amended soil during steady state. $NaH^{14}CO_3$ was added 28 days after initiation of the experiment and radioactive and non-radioactive CH_4 and CO_2 were followed by repeated sampling over the following 25 days until f_{H_2} had reached a constant value, which was 44 days after initiation of the experiment. H_2/CO_2 contributed $24 \pm 4\%$, $25 \pm 5\%$, $27 \pm 4\%$ and $11 \pm 3\%$ to CH_4 production in the incubations with stem straw, sheath straw, leaf straw and the unamended control, respectively.

4. Discussion

The production of CH_4 and CO_2 was increased by the addition of rice straw. The production of CH_4 started after a short lag phase with high production rates until a steady state was reached, whereas the production of CO_2 started immediately after the beginning of the incubation. These results are consistent with earlier experiments deal-

ing with the effect of addition of organic matter to rice paddy soil (see Section 1). The early CO_2 production is interpreted to be due to dominance of ferric iron reduction and sulfate reduction which is typical during the initial phase of anoxic incubation of rice field soil (i.e. the reduction phase), whereas CH_4 production becomes dominant in the methanogenic phase after ferric iron and sulfate have been reduced [30,31,49,50].

Addition of straw also stimulated the immediate but transient accumulation of fermentation products during the reduction phase. In this phase, the patterns of the formation of fermentation products were different when using different straw fractions. While propionate was the most dominant fermentation product next to acetate, with sheath and leaf straw, butyrate and caproate were more abundant with stem straw. In addition, much more H_2 and acetate were produced with stem straw than with the other straw fractions. These differences might result from the different composition of the fractions of straw. For example, the stem contains less hemicellulose than the other parts of the rice plant [22]. Joulain et al. [35] observed different fermentation patterns during the degradation of cellulose and xylan in paddy soil. Unamended soil

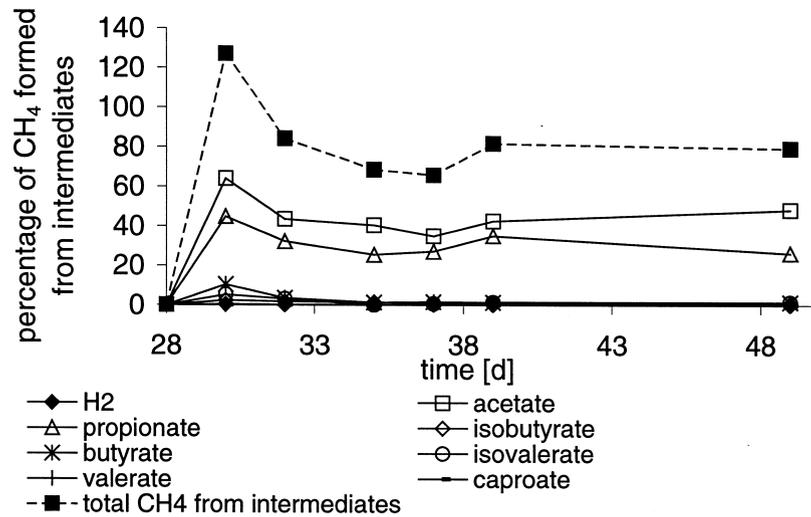


Fig. 5. Total amounts of intermediates accumulated in the presence of BES during the incubation of rice field soil with stem straw, converted to equivalent amounts of CH₄ and balanced against the CH₄ accumulated in the uninhibited control 21 days after addition of BES (i.e. day 49 of incubation).

also exhibited a transient accumulation of fermentation products, but fewer compounds and much lower concentrations were detected in the absence than in the presence of straw.

The fermentation patterns of the different straw fractions were also analyzed during the methanogenic phase, where the rate of CH₄ production was constant and the concentrations of fermentation products had decreased to

rather low concentrations (usually < 100 μM). The H₂ partial pressure was also constant at about 1.5–6 Pa, as typically observed during steady state conditions [28,30,50]. During this phase, the straw was fermented to mainly H₂, acetate, propionate, butyrate, isobutyrate, valerate and isovalerate which all accumulated when CH₄ production was inhibited by BES. Inhibition of methanogenesis not only resulted in the accumulation of acetate

Table 2

Total amounts of metabolites accumulated in the presence of BES and of CH₄ in the uninhibited control for three different fractions of rice straw incubated in anoxic paddy soil (days 28–49 of incubation)

Metabolite	Stem ^a	Leaf sheath	Leaf blade	Soil only
Total amounts (μmol bottle ⁻¹)				
H ₂	2.6	2.8	3.4	1.6
Acetate	577.5	397.2	674.8	131.6
Propionate	179.6	72.9	145.9	25.0
Butyrate	7.2	10.5	13.5	0.0
Isobutyrate	4.0	2.0	4.4	0.0
Isovalerate	5.8	1.7	4.0	0.0
Valerate	2.5	6.2	0.0	0.0
Equivalent acetate ^a	796.2	510.9	864.4	156.5
Equivalent H ₂	605.5	286.0	496.6	76.5
equivalent CH ₄	947.5	582.4	988.6	175.7
CH ₄ in control ^b	1197.6	702.9	1229.9	157.5
Equivalent CH ₄ (% of CH ₄ in the uninhibited control)				
H ₂	0.1	0.1	0.1	0.2
Acetate	48.2	56.5	54.9	83.5
Propionate	26.2	18.2	20.8	27.7
Butyrate	1.5	3.7	2.7	0
Isobutyrate	0.8	0.7	0.9	0
Isovalerate	1.6	0.8	1.0	0
Valerate	0.7	2.9	0	0
Total CH ₄ from metabolites	79.1	82.8	80.4	111.5
Via acetate ^c	84.0	87.7	87.4	89.1
Via H ₂	16.0	12.3	12.6	11.9

^aThe amounts of metabolites were converted to equivalent amounts of H₂, acetate and CH₄ according to the stoichiometries of their total conversion.

^bCH₄ in the uninhibited control minus CH₄ in the BES-inhibited samples.

^cEquivalent CH₄ produced from equivalent acetate or H₂ balanced against total CH₄ from metabolites.

and H₂, which are immediate methanogenic precursors, but also in other fermentation products. Thermodynamic calculations indicated that propionate, butyrate, valerate, isobutyrate and isovalerate would normally have been further degraded to H₂ and acetate, but accumulated when CH₄ production and consequently the removal of H₂ and acetate were inhibited.

In contrast to the initial reduction phase, in which incubations with stem straw exhibited a different fermentation pattern to those with other straw fractions, the fermentation patterns during the methanogenic phase were relatively uniform. Acetate was the most important intermediate during the decomposition of rice straw, followed by propionate. Mass balance calculations showed that these two compounds accounted for almost all of the CH₄ production. Other intermediates included compounds, which could not be identified, that were detected by HPLC analysis in all the incubations with straw but not without straw. Detection of unidentified compounds in porewater samples is not uncommon [51]. In our experiments, they had retention times of > 15 min, were only detected by UV absorption and may be degradation products of lignin complexes in the straw. Tsutsuki and Ponnampereuma [20] observed the production of phenolic compounds (*p*-hydroxy benzoic, vanillic, *p*-coumaric, ferulic and sinapic acids) in rice field soil, especially after amendment with rice straw. However, these compounds apparently contributed little to the CH₄ production in our experiments, as indicated by the rather good balance (about 80%) of identified compounds compared to CH₄ production.

Chin and Conrad [28] observed caproate as an intermediate in unamended paddy soil. Tsutsuki and Ponnampereuma [20] detected isovalerate in anoxic paddy soil, especially after addition of green manure. In our experiments, small amounts of isovalerate, but no caproate, accumulated in the BES-inhibited incubations of methanogenic soil irrespective of the presence and type of straw added. However, caproate was detected during the initial reduction phase which was still dominated by reduction of iron and sulfate. Intermediates found in other experiments with paddy soil [28,34,35] like lactate, succinate, formate, ethanol or isopropanol were not detected.

Unamended soil showed a similar pattern of methanogenic intermediates as straw-amended soil. This observation suggests that the soil organic matter that is methanogenically degraded has a similar composition to straw. This suggestion is not unreasonable, since most of the soil organic matter ultimately originates from dead primary production, i.e. the rice plant. Rice straw and other dead parts of the rice plant contribute to soil organic matter. The half life of rice straw in rice field soils is about 2 year, with 80–90% being decomposed during the first year [52]. Even if no straw is added to soil, the pool of soil organic matter may still contain straw particles from the last season that are methanogenically decomposed in a

similar way to freshly added straw. Thus, a distinction between soil organic matter on the one hand and straw on the other is ambiguous. More research on the time course of fragmentation and microbial decomposition of straw is needed to understand its fate and potential support of CH₄ production.

Radiotracer experiments showed that, in the incubations with straw, H₂ contributed about 25% to CH₄ production, whereas without addition of straw, the contribution was only 10%, indicating that acetate contributed 75% and 90%, respectively. The BES inhibition experiments indicated a contribution of acetate to CH₄ formation of 84–89% irrespective of the presence or absence of straw. In all cases, the contribution of acetate to CH₄ production was 75–90% and thus higher than the value of 66% that is theoretically expected from the degradation of polysaccharides [53]. The relatively high contribution of acetate to methanogenesis has already been observed in earlier experiments which also suggested an important contribution of homoacetogenesis to the overall degradation process [28,34,30,54].

In conclusion, we observed only little influence of the presence and the type of rice straw on the fermentative pathways used for CH₄ production when the soil had entered a stable methanogenic phase. Major differences in the fermentation patterns were only observed in the very early phase of anaerobic decomposition when CH₄ production had not yet established. Whether this change from the early phase to the steady state phase of anaerobic degradation was due to changes in the microbial community or to changes in the structure or composition of the rice straw is not known.

Acknowledgements

This study was part of the Sonderforschungsbereich 395 of the Deutsche Forschungsgemeinschaft 'Interaction, adaptation and catalytic capacity of terrestrial microorganisms'.

References

- [1] Cicerone, R.J. and Oremland, R.S. (1988) Biogeochemical aspects of atmospheric methane. *Glob. Biogeochem. Cycles* 2, 299–327.
- [2] Prinn, R. G. (1994) Global atmospheric-biospheric chemistry. In: *Global Atmospheric-Biospheric Chemistry* (Prinn, R.G., Ed.), pp. 1–18. Plenum, New York.
- [3] Conrad, R. (1993) Mechanisms controlling methane emission from wetland rice fields. In: *The Biogeochemistry of Global Change: Radiative Trace Gases* (Oremland, R.S., Ed.), pp. 317–335. Chapman and Hall, New York.
- [4] Neue, H.-U. and Sass, R. L. (1994) Trace gas emissions from rice fields. In: *Global Atmospheric-Biospheric Chemistry* (Prinn, R.G., Ed.), pp. 119–147. Plenum, New York.
- [5] Holzapfel-Pschorn, A., Conrad, R. and Seiler, W. (1986) Effects of

- vegetation on the emission of methane from submerged paddy soil. *Plant Soil* 92, 223–233.
- [6] Kimura, M., Miura, Y., Watanabe, A., Katoh, T. and Haraguchi, H. (1991) Methane emission from paddy field. 1. Effect of fertilization, growth stage and midsummer drainage pot experiment. *Environ. Sci.* 4, 265–271.
- [7] Minoda, T., Kimura, M. and Wada, E. (1996) Photosynthates as dominant source of CH₄ and CO₂ in soil water and CH₄ emitted to the atmosphere from paddy fields. *J. Geophys. Res.* 101, 21091–21097.
- [8] Chidthaisong, A. and Watanabe, I. (1997) Methane formation and emission from flooded rice soil incorporated with ¹³C-labeled rice straw. *Soil Biol. Biochem.* 29, 1173–1181.
- [9] Watanabe, A., Yoshida, M. and Kimura, M. (1998) Contribution of rice straw carbon to CH₄ emission from rice paddies using ¹³C-enriched rice straw. *J. Geophys. Res.* 103, 8237–8242.
- [10] Dannenberg, S. and Conrad, R. (1999) Effect of rice plants on methane production and rhizospheric metabolism in paddy soil. *Biogeochemistry* 45, 53–71.
- [11] Schütz, H., Holzapfel-Pschorn, A., Conrad, R., Rennenberg, H. and Seiler, W. (1989) A 3-year continuous record on the influence of daytime, season, and fertilizer treatment on methane emission rates from an Italian rice paddy. *J. Geophys. Res.* 94, 16405–16416.
- [12] Yagi, K. and Minami, K. (1990) Effect of organic matter application on methane emission from some Japanese paddy fields. *Soil Sci. Plant Nutr.* 36, 599–610.
- [13] Sass, R.L., Fisher, F.M., Turner, F.T. and Jund, M.F. (1991) Methane emission from rice fields as influenced by solar radiation, temperature, and straw incorporation. *Glob. Biogeochem. Cycles* 5, 335–350.
- [14] Delwiche, C.C. and Cicerone, R.J. (1993) Factors affecting methane production under rice. *Glob. Biogeochem. Cycles* 7, 143–155.
- [15] Denier van der Gon, H.A.C. and Neue, H.U. (1995) Influence of organic matter incorporation on the methane emission from a wetland rice field. *Glob. Biogeochem. Cycles* 9, 11–22.
- [16] Chidthaisong, A., Inubushi, K., Muramatsu, Y. and Watanabe, I. (1996) Production potential and emission of methane in flooded rice soil microcosms after continuous application of straws. *Microbes Environ.* 11, 73–78.
- [17] Rath, A.K., Mohanty, S.R., Mishra, S., Kumaraswamy, S., Ramakrishnan, B. and Sethunathan, N. (1999) Methane production in unamended and rice-straw-amended soil at different moisture levels. *Biol. Fertil. Soils* 28, 145–149.
- [18] Watanabe, A. and Kimura, M. (1998) Effect of rice straw application on CH₄ emission from paddy fields. 4. influence of rice straw incorporated during the previous cropping period. *Soil Sci. Plant Nutr.* 44, 507–512.
- [19] Huang, Y., Sass, R.L. and Fisher, F.M. (1998) A semi-empirical model of methane emission from flooded rice paddy soils (review). *Glob. Change Biol.* 4, 247–268.
- [20] Tsutsuki, K. and Ponnamperna, F.N. (1987) Behavior of anaerobic decomposition products in submerged soils. Effects of organic material amendment, soil properties, and temperature. *Soil Sci. Plant Nutr.* 33, 13–33.
- [21] Watanabe, A., Katoh, K. and Kimura, M. (1993) Effect of rice straw application on CH₄ emission from paddy fields. 2. contribution of organic constituents in rice straw. *Soil Sci. Plant Nutr.* 39, 707–712.
- [22] Shen, H.S., Ni, D.B. and Sundstøl, F. (1998) Studies on untreated and urea-treated rice straw from three cultivation seasons: 1. Physical and chemical measurements in straw and straw reactions. *Anim. Feed Sci. Technol.* 73, 243–261.
- [23] Zeikus, J.G. (1981) Lignin metabolism and the carbon cycle. *Adv. Microb. Ecol.* 5, 211–243.
- [24] Benner, R., Maccubbin, A.E. and Hodson, R.E. (1984) Anaerobic biodegradation of the lignin and polysaccharide components of lignocellulose and synthetic lignin by sediment microflora. *Appl. Environ. Microbiol.* 47, 998–1004.
- [25] Zehnder, A.J.B. (1978) Ecology of methane formation. In: *Water Pollution Microbiology*, Vol. 2 (Mitchell, R., Ed.), pp. 349–376. Wiley, New York.
- [26] Schink, B. (1992) Syntrophism among prokaryotes. In: *The Prokaryotes*, Vol. 1 (Balows, A., Trüper, H.G., Dworkin, M., Harder, W. and Schleifer, K.H., Eds.), pp. 276–299. Springer, New York.
- [27] Stams, A.J.M. (1994) Metabolic interactions between anaerobic bacteria in methanogenic environments. *Antonie van Leeuwenhoek* 66, 271–294.
- [28] Chin, K.J. and Conrad, R. (1995) Intermediary metabolism in methanogenic paddy soil and the influence of temperature. *FEMS Microbiol. Ecol.* 18, 85–102.
- [29] Achnich, C., Bak, F. and Conrad, R. (1995) Competition for electron donors among nitrate reducers, ferric iron reducers, sulfate reducers, and methanogens in anoxic paddy soil. *Biol. Fertil. Soils* 19, 65–72.
- [30] Krylova, N.I., Janssen, P.H. and Conrad, R. (1997) Turnover of propionate in methanogenic paddy soil. *FEMS Microbiol. Ecol.* 23, 107–117.
- [31] Klüber, H.D. and Conrad, R. (1998) Effects of nitrate, nitrite, NO and N₂O on methanogenesis and other redox processes in anoxic rice field soil. *FEMS Microbiol. Ecol.* 25, 301–318.
- [32] Yamane, I. and Sato, K. (1964) Decomposition of glucose and gas formation in flooded soil. *Soil Sci. Plant Nutr.* 10, 35–41.
- [33] Saito, M., Wada, H. and Takai, Y. (1990) Development of a microbial community on cellulose buried in waterlogged soil. *Biol. Fertil. Soils* 9, 301–305.
- [34] Krumböck, M. and Conrad, R. (1991) Metabolism of position-labelled glucose in anoxic methanogenic paddy soil and lake sediment. *FEMS Microbiol. Ecol.* 85, 247–256.
- [35] Joulain, C., Ollivier, B., Neue, H.U. and Roger, P.A. (1996) Microbiological aspects of methane emission by a ricefield soil from the Camargue (France). 1. Methanogenesis and related microflora. *Eur. J. Soil Biol.* 32, 61–70.
- [36] Chin, K.J., Rainey, F.A., Janssen, P.H. and Conrad, R. (1998) Methanogenic degradation of polysaccharides and the characterization of polysaccharolytic clostridia from anoxic rice field soil. *Syst. Appl. Microbiol.* 21, 185–200.
- [37] Chidthaisong, A., Rosenstock, B. and Conrad, R. (1999) Measurement of monosaccharides and conversion of glucose to acetate in anoxic rice field soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 2350–2355.
- [38] Chidthaisong, A. and Conrad, R. (1999) Pattern of non-methanogenic and methanogenic degradation of cellulose in anoxic rice field soil. *FEMS Microbiol. Ecol.* (in press).
- [39] Bae, H.D., Mcallister, T.A., Kokko, E.G., Leggett, F.L., Yanke, L.J., Jakober, K.D., Ha, J.K., Shin, H.T. and Cheng, K.J. (1997) Effect of silica on the colonization of rice straw by ruminal bacteria. *Anim. Feed Sci. Technol.* 65, 165–181.
- [40] Oremland, R.S. and Capone, D.G. (1988) Use of 'specific' inhibitors in biogeochemistry and microbial ecology. *Adv. Microb. Ecol.* 10, 285–383.
- [41] Rothfuss, F. and Conrad, R. (1993) Thermodynamics of methanogenic intermediary metabolism in littoral sediment of Lake Constance. *FEMS Microbiol. Ecol.* 12, 265–276.
- [42] Conrad, R. and Schütz, H. (1988) Methods of studying methanogenic bacteria and methanogenic activities in aquatic environments. In: *Methods in Aquatic Bacteriology* (Austin, B., Ed.), pp. 301–343. Wiley, Chichester.
- [43] Dannenberg, S., Wudler, J. and Conrad, R. (1997) Agitation of anoxic paddy soil slurries affects the performance of the methanogenic microbial community. *FEMS Microbiol. Ecol.* 22, 257–263.
- [44] Conrad, R., Mayer, H.P. and Wüst, M. (1989) Temporal change of gas metabolism by hydrogen-syntrophic methanogenic bacterial associations in anoxic paddy soil. *FEMS Microbiol. Ecol.* 62, 265–274.
- [45] Schuler, S. and Conrad, R. (1990) Soils contain two different activities for oxidation of hydrogen. *FEMS Microbiol. Ecol.* 73, 77–84.
- [46] Thauer, R.K., Jungermann, K. and Decker, K. (1977) Energy con-

- ervation in chemotrophic anaerobic bacteria. *Bacteriol. Rev.* 41, 100–180.
- [47] Stieb, M. and Schink, B. (1986) Anaerobic degradation of isovalerate by a defined methanogenic coculture. *Arch. Microbiol.* 144, 291–295.
- [48] Wu, W.M., Jain, M.K., Hickey, R.F. and Zeikus, J.G. (1996) Perturbation of syntrophic isobutyrate and butyrate degradation with formate and hydrogen. *Biotechnol. Bioeng.* 52, 404–411.
- [49] Yao, H., Conrad, R., Wassmann, R. and Neue, U. (1999) Effect of soil characteristics on sequential reduction and methane production in sixteen rice paddy soils from China, the Philippines, and Italy. *Biogeochemistry* 47, 269–295.
- [50] Yao, H. and Conrad, R. (1999) Thermodynamics of methane production in different rice paddy soils from China, the Philippines and Italy. *Soil Biol. Biochem.* 31, 463–473.
- [51] Albert, D.B. and Martens, C.S. (1997) Determination of low-molecular-weight organic acid concentrations in seawater and pore-water samples via HPLC. *Mar. Chem.* 56, 27–37.
- [52] Neue, H.U. and Scharpenseel, H.W. (1987) Decomposition pattern of ¹⁴C-labeled rice straw in aerobic and submerged rice soils of the Philippines. *Sci. Total Environ.* 62, 431–434.
- [53] 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.
- [54] Thebrath, B., Mayer, H.P. and Conrad, R. (1992) Bicarbonate-dependent production and methanogenic consumption of acetate in anoxic paddy soil. *FEMS Microbiol. Ecol.* 86, 295–302.

Lebenslauf

Name: Kristin Glißmann
Anschrift: Fontanestraße 11
35039 Marburg
geboren: am 16.10.1969 in Aachen
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung:

1976 - 1980 Gemeinschaftsgrundschule Linden-Neusen
1980 - 1989 Heilig-Geist-Gymnasium, Würselen
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Studium:

1989 - 1996 Studium der Biologie (Diplom) an der Rheinisch-
Westfälischen Technischen Hochschule (RWTH) Aachen
1995 - 1996 Diplomarbeit am Institut für Hygiene und Umweltmedizin
Thema: Toxikologische Bewertung von Böden über die
Erfassung der Bodenatmung und andere Biotestverfahren
Juni 1996 Abschluss des Studiums mit dem Diplom

Promotion:

seit November 1997 Anfertigung der vorliegenden Dissertation
am Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie,
Marburg; unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Ralf Conrad

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Ralf Conrad für die Bereitstellung des Themas, die Betreuung meiner Doktorarbeit und die ständige Diskussionsbereitschaft.

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Rudolf Thauer für die Begutachtung der Arbeit.

Sabine Weber, mit der ich mir das Reisstroh teilte, danke ich für die gute Zusammenarbeit und interessanten Gespräche inner- und außerhalb des Labors.

Bedanken möchte ich mich auch bei der ganzen Abteilung Biogeochemie für das nette Arbeitsklima und die überall zu findende Hilfsbereitschaft. Besonders genannt seien hier Bernhard Nüßlein und Melanie Klose, die meine Hilfeschreie am GC und der HPLC oder nach Schokolade immer erhörten, Dr. Hans Scholten und Dr. Kuk-Jeong Chin für viele hilfreiche Diskussionen und Udo Jäckel und Martin Krüger, die mir mit Rat und Tat zur Seite standen.

Lieben Dank an alle Freunde für die Energie, die sie mir gegeben haben, und die Geduld, die sie besonders in den letzten Monaten gezeigt haben. Danke Alexandra, Deanny (die auch noch das letzte falsche "ß" in der Arbeit fand), Janine, Maik, Sabine, Tobi, Verena und last not least Wiebke! Danke Sabine und Dirk, ohne Euch wäre ich nie bis hierher gekommen!

Meinen Eltern möchte ich dafür danken, dass sie mein Studium und vieles mehr möglich gemacht haben, und dafür, dass sie auch während der Doktorarbeit wie immer stets für mich da waren.

Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation „Methanogene Zersetzung von Stroh im Reisfeldboden“ selbstständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

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

Marburg, den 24.10.2000