



JUSTUS-LIEBIG-UNIVERSITÄT
GIESSEN

Institut für Angewandte Mikrobiologie

**Thermophile methanogene *Archaea* in Kompost:
Zeitliche Veränderung der Populationszusammensetzung, potentielle
Aktivität und Verbreitung**

DISSERTATION

zur

Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Naturwissenschaften

(Dr.rer.nat.)

dem Fachbereich

Agrarwissenschaften, Ökotoxologie und Umweltmanagement

und der gemeinsamen Kommission Naturwissenschaften

vorgelegt von

Kathrin Thummes

Gießen, im April 2008

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden von August 2004 bis August 2007 am Institut für Angewandte Mikrobiologie der Universität Gießen unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Dr.-Ing. Peter Kämpfer durchgeführt.

Vom Fachbereich Biologie und Chemie als Dissertation angenommen im April 2007.

Erstgutachter: Herr Prof. Dr. Dr.-Ing. Peter Kämpfer

Zweitgutachter: Herr Prof. Dr. Dr. h.c. Hans-Jürgen Jäger

Tag der Disputation:

Teile der in der vorliegenden Dissertation erzielten Ergebnisse wurden in folgenden Publikationen veröffentlicht:

Thummes, K., Kämpfer, P., Jäckel, U. (2007) Temporal change of composition and potential activity of the thermophilic archaeal community during the composting of organic material. *Systematic and Applied Microbiology* 30: 418-429.

Thummes, K., Schäfer, J., Kämpfer, P., Jäckel, U. (2007) Thermophilic methanogenic *Archaea* in compost material: occurrence, persistence and possible mechanisms for their distribution to other environments. *Systematic and Applied Microbiology* 30: 634-643.

Für Emil

INHALT

Abkürzungen	8
Zusammenfassung	10
1 Einleitung	1
1.1 Methan	1
1.2 Thermophile methanogene <i>Archaea</i>	6
1.3 Kompostierung	9
1.3.1 <i>Methan und Kompostierung</i>	12
1.4 Ziele der Arbeit	13
2 Material und Methoden	14
2.1 Chemikalien und Gase	14
2.2 Proben	14
2.2.1 <i>Kompostierungsanlagen, Komposte und Mist</i>	15
2.2.2 <i>Komposte: Probennahme und übergreifende Probenaufbereitung</i>	18
2.2.3 <i>Böden</i>	18
2.2.4 <i>Böden: Probennahme und übergreifende Probenaufbereitung</i>	22
2.3 Sammlung von Mikroorganismen auf der CC Kompostierungsanlage mittels Filtration	23
2.4 Analytische Methoden	24
2.4.1 <i>pH-Wert</i>	24
2.4.2 <i>Gravimetrischer Wassergehalt und maximale Wasserhaltekapazität</i>	24
2.4.3 <i>Bestimmung des Gehaltes an wasserlöslichem Kohlenstoff</i>	24
2.4.4 <i>Bestimmung des C/N-Verhältnisses und der Summe an C, N und S</i>	25
2.4.5 <i>Konzentrationsbestimmung organischer Säuren mittels HPLC</i>	25
2.4.6 <i>Analysen der Bodenproben aus Linz, Österreich</i>	26
2.4.7 <i>Gaschromatographische Messung der potentiellen Methanbildung</i>	27
2.4.7.1 <i>Berechnungen der Methankonzentrationen</i>	28
2.4.8 <i>Statistische Auswertung</i>	29
2.5 Inkubationsexperimente zur potentiellen Methanbildung	29
2.5.1 <i>Einfluss der Temperatur auf die potentielle Methanbildung</i>	29
2.5.2 <i>Einfluss von UV-Bestrahlung auf die potentielle Methanbildung</i>	29
2.5.3 <i>Einfluss von Substratzugabe auf die potentielle Methanbildung</i>	29
2.5.4 <i>Einfluss der Austrocknung des Kompostmaterials auf die potentielle Methanbildung</i>	30
2.5.5 <i>Einfluss des pH-Wertes im Kompostmaterial auf die potentielle Methanbildung</i>	30
2.5.6 <i>Einfluss der Sauerstoffkonzentration auf die potentielle Methanbildung</i>	31
2.5.7 <i>Inkubationsexperiment mit luftgetragenen thermophilen Methanogenen</i>	31
2.5.7.1 <i>Herstellung des Mediums zur Inkubation nach Widdel und Bak, 1992</i>	31
2.5.7.2 <i>Inkubation der auf die Gelatinefilter beaufschlagten Methanogenen</i>	34
2.6 Bestimmung der <i>In situ</i> Methankonzentrationen im Profil von Kompostmieten	34
2.6.1 <i>Bestimmung des pH-Wertes und des Wassergehaltes im Profil einer Kompostmiete</i>	35
2.7 Molekularbiologische Untersuchungen	36
2.7.1 <i>Extraktion der genomischen DNA</i>	36
2.7.1.1 <i>DNA Extraktion aus Kompost, Boden und Mist</i>	36

2.7.1.2 DNA Extraktion aus den auf Gelatinefiltern beaufschlagten Mikroorganismen	37
2.7.1.3 DNA Extraktion aus Flüssigkulturen der auf Gelatinefiltern gesammelten Mikroorganismen	37
2.7.2 PCR.....	37
2.7.2.1 Quantifizierung von Archaea und Bacteria in CC Kompostmaterial	38
2.7.2.2 Realtime-PCR	39
2.7.2.3 Entwicklung spezifischer Primersysteme für die Detektion thermophiler methanogener Archaea und Optimierung der PCR Reaktion	41
2.7.3 Single Strand Conformation Polymorphism (PCR-SSCP)	43
2.7.3.1 Vorbereitung der Proben für die SSCP	43
2.7.3.2 Herstellung des Polyacrylamidgels und Elektrophorese	44
2.7.3.3 Silberfärbung der DNA und Clusteranalyse der Bandenmuster	46
2.7.4 Klonierung.....	47
2.7.4.1 Aufreinigung der PCR-Produkte	47
2.7.4.2 Durchführung der Klonierung mit unterschiedlichen Proben	47
2.7.4.3 RFLP Analyse – Restriction Fragment Length Polymorphism	49
2.7.4.4 Plasmidextraktion	50
2.7.5 Sequenzierung und phylogenetische Analyse	51
2.7.6 Statistische Analyse	51
2.7.7 Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP).....	52
3. Ergebnisse	53
3.1 <i>In situ</i> Methankonzentration, Temperatur, pH-Wert und Wassergehalt im Tiefenprofil einer 6 Wochen alten CC Kompostmiete.....	53
3.2 Potentielle Methanbildung verschiedener Komposte und Mist.....	53
3.3 Quantifizierung von <i>Archaea</i> in CC Kompostmaterial	55
3.4 Diversität methanogener <i>Archaea</i> in Kompost und Veränderungen in der methanogenen Population während des Kompostierungsprozesses.....	55
3.4.1 Veränderung der Temperaturoptima für die potentielle Methanbildung in unterschiedlich alten CC Kompostmaterialien	55
3.4.2 Klonierungsanalyse - CC Kompost	56
3.4.2.1 „Rarefaction“-Analyse	58
3.4.2.2 Diversitätsindices	59
3.4.2.3 Phylogenetische Analyse	60
3.4.3 Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP) - CC Kompost	62
3.5 Einflussfaktoren auf die potentielle Methanbildung und die Diversität der methanogenen <i>Archaea</i> – CC Kompost	64
3.5.1 Einfluss der Temperatur auf die <i>Archaea</i> Population.....	64
3.5.2 Einfluss des pH-Wertes auf die potentielle Methanbildung im Kompostmaterial	65
3.5.2.1 Organische Säuren im Kompostmaterial	66
3.5.3 Zusatz von Acetat und Wasserstoff zu anoxischen Inkubationen von Kompostmaterial	67
3.5.4 Einfluss der Sauerstoffkonzentration.....	68
3.6 Entwicklung spezifischer Primersysteme für thermophile <i>Archaea</i>	69
3.7 Vorkommen thermophiler methanogener <i>Archaea</i> in verschiedenen Komposten und Mist.....	71
3.7.1 SSCP-„Fingerprint“ verschiedener Kompostmaterialien mit anschließender Sub-Klonierung.....	71

3.7.1.1 Clusteranalyse der SSCP-Bandenmuster verschiedener Komposte	73
3.7.2 SSCP-„Fingerprint“ unterschiedlicher organischer Materialien	74
3.7.3 Nachweis von <i>Ms. thermophila</i> , <i>Mc. thermophilus</i> und <i>Methanothermobacter sp.</i> in verschiedenen Komposten und Mist mittels PCR	75
3.8 Untersuchung von Bioaerosolen der CC Kompostierungsanlage- Verbreitung methanogener <i>Archaea</i> über die Luft	76
3.8.1 Einfluss der Austrocknung von Kompostmaterial unter oxischen Bedingungen auf die potentielle Methanbildung	78
3.8.2 Einfluss von UV-Strahlung auf die potentielle Methanbildung	79
3.9 Kompost als Dünger – Böden der Versuchstation Linz/Österreich	80
3.9.1 Clusteranalyse der chemische Eigenschaften der Bodenproben aus Linz	80
3.9.2 Thermophile Methanbildung in mit Kompost gedüngten Böden	81
3.9.3 Detektion thermophiler methanogener <i>Archaea</i> mittels SSCP und PCR	82
3.10 Vorkommen thermophiler methanogener <i>Archaea</i> in oxischen Böden	83
3.10.1 Thermophiles Methanbildungspotential und chemische Eigenschaften der Acker- und Grünlandböden	83
3.10.2 Detektion thermophiler methanogener <i>Archaea</i> mittels SSCP und PCR in oxischen Böden	87
4 Diskussion	89
4.1 Methanbildung im Kompostmaterial	89
4.2 Diversität methanogener <i>Archaea</i> in Kompostmaterial	92
4.3 Veränderung der Diversität im Laufe des Kompostierungsprozesses	99
4.3.1 Einfluss der Temperatur auf die <i>Archaea</i> Diversität im Kompostmaterial	101
4.3.2 Einfluss der Substrate auf die <i>Archaea</i> -Diversität im Kompostmaterial	102
4.3.3 Einfluss des pH-Wertes auf die potentielle Methanbildung	103
4.4 Unterschiedliche Komposte	104
4.4.1 Entwicklung spezifischer Primersysteme	104
4.4.2 Untersuchung verschiedener Komposte und Mist	104
4.5 Verbreitung thermophiler methanogener <i>Archaea</i> über die Kompostierung	108
4.5.1 Möglichkeit der Verbreitung thermophiler Methanogener über die Luft	108
4.5.2 Verbreitung thermophiler Methanogener über die Düngung	110
4.5.3 Vorkommen thermophiler methanogener <i>Archaea</i> in nicht wassergesättigten, gemäßigten Böden	114
5 Allgemeine Schlussbetrachtung	115
6 Literatur	116
7 Internetquellen	131
Anhang A	132
Anhang B	144
Erklärung	154

Abkürzungen

a	Jahr
Acc.Nr.	“Accession”-Nummer
BLAST	<u>B</u> asic <u>L</u> ocal <u>A</u> lignment <u>S</u> earch <u>T</u> ool
ca.	Circa
dNTP	Desoxynucleosid-5'-Triphosphat
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetra-Acetat
evtl.	Eventuell
g	Gramm
g-TG	Gramm Trockengewicht
g-FG	Gramm Frischgewicht
GW	Gravimetrischer Wassergehalt
h	Stunde
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
l	Liter
k.A.	Keine Angabe(n)
m	Meter
M	Molar (mol l^{-1})
MEGA	<u>M</u> olecular <u>E</u> volutionary <u>G</u> enetics <u>A</u> nalysis
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
MPN	<u>M</u> ost <u>P</u> robable <u>N</u> umber
mWHK	Maximale Wasserhaltekapazität
OTU	<u>O</u> perational <u>T</u> axonomic <u>U</u> nit
PCR	<u>P</u> olymerase <u>C</u> hain <u>R</u> eaction
ppmv	Mischungsverhältnis: parts per million by volume
SA	Standardabweichung
s	Sekunde
SSCP	<u>S</u> ingle <u>S</u> trand <u>C</u> onformation <u>P</u> olymorphism
s.o.	Siehe oben
s.u.	Siehe unten
TBE	Tris-Borat-EDTA

u.a.	Unter anderem
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galactopyronosid
z. B.	Zum Beispiel

Zusammenfassung

Die Kompostierung als vorwiegend aerober Abbauprozess organischen Abfalls wurde bisher als Habitat für methanogene Mikroorganismen wenig beachtet, obwohl vereinzelt Methanemissionen aus Kompostmieten beschrieben wurden. In der vorliegenden Arbeit konnte ein Vorkommen moderat thermophiler methanbildender *Archaea* in acht untersuchten Kompostmaterialien gezeigt werden. So wurde unabhängig von dem Ursprung des zu kompostierenden Materials und der Kompostprozessierung ein Temperaturoptimum für die potentielle Methanbildung bei 50 °C bzw. bei 65 °C festgestellt. Bei 50 °C lag die Methanbildungsrate der Materialien zwischen 10,1 und 977,7 nmol CH₄ g-TG⁻¹ h⁻¹. Unabhängige Quantifizierungsansätze mittels MPN- PCR-Analyse und Berechnungen unter Einbeziehung der Methanbildungsrate zeigten mit Werten von 0,2 bis 6×10^7 Zellen g-TG⁻¹ eine hohe Anzahl an *Archaea* im Kompostmaterial.

Detaillierte molekularbiologische Untersuchungen von Material einer ausgewählten Kompostierungsanlage verschafften einen tieferen Einblick in die vorhandene *Archaea*-Gemeinschaft. Auf Grund der erhaltenen Ergebnisse muss vermutet werden, dass die *Archaea*-Population im Kompost durch *Methanosarcina thermophila* und Spezies der Gattung *Methanothermobacter* dominiert wird. Darüber hinaus konnten Hinweise auf das Vorkommen weiterer moderat thermophiler Methanogener wie *Methanoculleus thermophilus* und *Methanobacterium formicicum* erhalten werden. Insgesamt wurde im reifen Kompostmaterial die höchste Diversität von *Archaea* festgestellt. Hier zeigte sich, dass 33 % der über die Klonierung detektierten 16S rRNA-Gensequenzen *Archaea* wie u.a. „Rice Cluster“-I (RC-I), RC-III und dem nicht methanogenen RC-IV zuzuordnen waren. Die Mitglieder dieser Cluster wurden in mehreren Studien im Wurzelraum von Reispflanzen detektiert, und erst kürzlich konnte ein Stamm des RC-I auch isoliert werden. In der vorliegenden Arbeit konnte nach der Untersuchung unterschiedlicher Kompostmaterialien über eine PCR-SSCP Analyse („single-strand-conformation-polymorphism“) festgestellt werden, dass Vorkommen und Anreicherung verschiedener thermophiler methanogener Spezies in Komposten verschiedener Anlagen abhängig von dem zu kompostierenden Material sind.

Die durch Klonierung und T-RFLP („terminal-restriction-fragment-length-polymorphism“) erhaltenen Ergebnisse sowie die Feststellung unterschiedlicher Temperaturoptima für die potentielle Methanbildung verschieden alter Kompostmaterialien, machten einen Populationsshift der methanogenen *Archaea* im Laufe des Kompostierungsprozesses offensichtlich. Gezielte Untersuchungen mittels PCR-SSCP Analysen konnten in diesem

Zusammenhang vor allem den Einfluss der im Material herrschenden Temperaturen und der Substratverfügbarkeit auf diese Sukzession deutlich machen.

Die Beobachtung, dass in 23 von 29 überwiegend oxischen Böden das Potential zur Methanbildung bei höheren Temperaturen vorhanden war, lieferte deutliche Hinweise auf eine weite Verbreitung thermophiler methanogener Mikroorganismen.

Die Möglichkeit einer Verbreitung der thermophilen Methanogenen aus Kompost über die Luft wurde durch die Untersuchung von Bioaerosolen einer Kompostierungsanlage bestätigt. Diese zeigten ein dem korrespondierenden Kompostmaterial ähnliches *Archaea* SSCP-Profil sowie ein deutliches Methanbildungspotential bei 50 °C (nach 5 Tagen Inkubation in *Methanosarcina thermophila* spezifischer Nährlösung bis 35000 ppmv). Die Vermutung einer Verbreitung der Methanogenen über die Luft wurde durch die *in vitro* beobachtete Widerstandsfähigkeit der *Archaea* gegen UV-Licht und Austrocknung unterstützt. Ebenso konnte eine Persistenz der Methanogenen aus Kompost in überwiegend oxischen Böden festgestellt werden und es wurde deutlich, dass die Entwicklung der *Archaea* Gemeinschaft im Boden abhängig von dem als Dünger eingesetzten Kompost sein kann.

1 Einleitung

1.1 Methan

Im Jahre 1776 führte Alessandro Volta Experimente mit „entflammbarer Luft“ durch, die während des Aufwühlens von Sedimenten in den Sümpfen des Lago Maggiore aufstieg. Über ein Jahrhundert später wurde dieses Gas als Methan identifiziert. Methan ist der Hauptbestandteil von Erdgas und Biogas, hochentzündlich und kann somit als Heizgas verwendet werden. Wirtschaftlich wird es aus Biogasanlagen genutzt, wobei das Rohbiogas jedoch häufig einen für die Wärmeerzeugung zu geringen Methananteil von ca. 60 % aufweist und daher vor der Nutzung aufbereitet werden muss. Neben den wirtschaftlich und ökologisch nützlichen Eigenschaften ist Methan allerdings, wie CO₂, N₂O und H₂O-Dampf, ein sehr wirksames Treibhausgas. Es besitzt im Vergleich zu CO₂ eine ca. 24 mal effektivere Absorption der von der Erdoberfläche reflektierten Infrarotstrahlung (WMO, 1999). Somit ist es das zweit wichtigste Treibhausgas unserer Atmosphäre, obwohl dort die Konzentration im Gegensatz zu der von CO₂ (379 ppmv; IPCC, 2007) recht gering ist. Zusätzlich entstehen durch photochemische Reaktionen des Methans andere Treibhausgase wie H₂O-Dampf, CO₂ und Ozon in der Atmosphäre.

Bildung und Abbau des Methans sind zu einem großen Anteil an biologische Prozesse gebunden, die in einem Kreislauf miteinander verknüpft sind. Dieser wird von zwei Mikroorganismengruppen maßgeblich beeinflusst, den methanogenen *Archaea*, den methanotrophen Proteobakterien und, wie eine aktuelle Studie zeigt, extrem acidophilen Mitgliedern des Phylums *Verrucomicrobia* (Dunfield *et al.*, 2007). Organische Substanz wird durch anaerobe Mikroorganismen u.a zu Wasserstoff, Kohlendioxid und Acetat abgebaut. Diese Verbindungen nutzen die Methanogenen als Substrate und wandeln sie in einem finalen Schritt des anaeroben Abbaus, der Methanogenese, unter Energiegewinn zu Methan um. Rund 80 % des global gebildeten Methans entstehen durch diesen biologischen Prozess (Heyer, 1990). Die wichtigsten Quellen für atmosphärisches Methan - und somit Habitate der Methanogenen - sind Wiederkäuer, Reisfelder, Feuchtgebiete und Termiten. Feuchtgebiete und Termiten gehören zu den natürlichen Methanquellen, wobei Wiederkäuer und Reisfelder zu den anthropogen beeinflussten Quellen zählen. An der Gesamtmethanemission sind die anthropogenen Quellen mit einem Anteil von rund 70 % beteiligt (ca. 375 Tg a⁻¹; Wuebbels und Hayhoe, 2000). Nur etwa 20 % der globalen

Methanemissionen sind auf nicht biogene Quellen, wie Kohlegruben, Erdölindustrie und Biomasseverbrennung, zurückzuführen.

Im Vergleich zu den zahlreichen Quellen für atmosphärisches Methan existieren nur wenige Senken. Durch photochemische Reaktionen mit Hydroxylradikalen werden ca. 500 Tg CH₄ a⁻¹ in der Atmosphäre oxidiert. Diese Reaktion zählt folglich zu den wichtigsten nicht biogenen Methansenken. Durch Diffusion gelangen etwa 40 Tg CH₄ a⁻¹ in die Stratosphäre und ca. 30 Tg CH₄ a⁻¹ werden durch methanotrophe Bodenbakterien zu CO₂ oxidiert (Wuebbles und Hayhoe, 2000).

Auf beide Organismengruppen, methanogene *Archaea* und methanotrophe *Proteobacteria*, soll im Folgenden näher eingegangen werden.

Spätestens nach der Isolation von *Methanobacillus omelianskii* (Barker, 1940) war eindeutig belegt, dass es sich bei der Methanformation in anoxischen Habitaten um einen mikrobiellen Prozess handelte, und es konnten nähere Experimente zur Methanogenese durchgeführt werden. Die relativ einfache Methode der Kultivierung von Methanogenen war ausschlaggebend für die Entdeckung der Domäne der *Archaea* (Woese und Fox, 1977). Basierend auf dem 16S rRNA-Gen als phylogenetischem Marker schlugen Woese *et al.* (1990) die Einteilung der Domänen des Lebens in *Archaea*, *Bacteria* und *Eukarya* vor. *Archaea* unterscheiden sich morphologisch kaum von den Bakterien, dennoch sind sie auf Grund ihrer 16S rRNA-Gene näher mit den Eukaryoten verwandt. *Archaea* unterscheiden sich von den Bakterien im Aufbau ihrer Zellwand (kein Peptidoglycan), der Zusammensetzung und Bindung der Membranlipide (Isoprene gebunden durch Etherbindungen), dem Aufbau der RNA Polymerase (mehrere verschiedene Enzyme mit 8-12 Untereinheiten) und dem Ablauf der Proteinsynthese (Initiatoraminosäure an der t-RNA ist Methionin).

Die Domäne der *Archaea* besteht derzeit offiziell aus zwei Phyla, den *Euryarchaea* und den *Crenarchaea* (Garrity und Holt, 2001). Vor einigen Jahren wurden Vorschläge zur Beschreibung von weiteren Phyla wie den „*Korarchaeota*“ (Barns *et al.*, 1996) und den „*Nanoarchaea*“ (Huber *et al.*, 2002) veröffentlicht. Die offizielle Einführung dieser Phyla in die Domäne der *Archaea* ist jedoch bis heute umstritten (Auchtung *et al.*, 2006; Brochier *et al.*, 2005).

Innerhalb des Phylums der *Euryarchaea*, welches insgesamt aus sieben Klassen besteht, sind die Methanogenen in drei Klassen vertreten: den *Methanobacteria*, den *Methanococci* und den *Methanopyri*. Die Klassen der *Methanobacteria* und der *Methanopyri* beinhalten

jeweils eine Ordnung, die *Methanobacteriales* und die *Methanopyrales*. Die Klasse der *Methanococci* wird in drei Ordnungen unterteilt. Diese werden benannt als die Ordnung der *Methanococcales*, *Methanomicrobiales* und *Methanosarcinales* (Garrity und Holt, 2001). In diesen fünf Ordnungen der Methanogenen *Archaea* sind in insgesamt 10 Familien ca. 83 Spezies beschrieben (Garcia *et al.*, 2000).

Methanogene *Archaea* bilden eine Gruppe strikt anaerober prokaryontischer Mikroorganismen. Die Morphologie der Methanogenen ist sehr vielfältig und umfasst alle Grundtypen. Die einzigen Stoffwechselprodukte sind CH₄ und CO₂. Die Methanogenen sind extrem spezialisiert und können nur eine begrenzte Anzahl an Substraten verwerten: H₂/CO₂ und Acetat, aber auch Formiat, Methanol, Methylamine und CO. Auf Grund ihres Substratverwertungsspektrums kann man die Methanogenen in drei Hauptgruppen unterteilen. Eine Gruppe, in der sich die meisten der Spezies wiederfinden, ist hydrogenotroph bzw. kann Formiat als terminalen Elektronenakzeptor nutzen. Die zweite Gruppe ist fähig, Methylkomponenten zu nutzen und die dritte Gruppe stellt die der acetogenen Methanogenen dar. Da die Methanogenen polymere organische Verbindungen nicht eigenständig abbauen können, sind sie von anderen Organismen der anaeroben Abbaukette abhängig. Allen gemeinsam ist, dass sie ein Redoxpotential von unter -300mV für ihr Wachstum und die Methanbildung bevorzugen, d.h die Habitate der Methanogenen sind auf diejenigen mit anoxischen Verhältnissen begrenzt. Trotzdem können diese Mikroorganismen eine Vielzahl unterschiedlicher Umwelten besiedeln. Allein auf die Temperatur bezogen kommen Methanogene in Umwelten mit Temperaturspannen von 0 – 100 °C vor. Sie wurden aus Proben der polaren Regionen isoliert, ebenso wie aus Säugetierdärmen oder aus heißen Geysiren (Chaban *et al.*, 2006).

Garcia *et al.* (2000) beschrieben eine Einteilung der Lebensräume der Methanogenen in drei ausgedehnte Ökosysteme. Das erste fasst die Habitate zusammen, in denen komplexe organische Verbindungen komplett zu CH₄ und CO₂ abgebaut werden. Dazu zählen Sümpfe, Moore, Reisfelder, Frischwassersedimente, Faultürme und Biogasanlagen. Des Weiteren zählt der Verdauungstrakt der meisten Tiere zu den Lebensräumen der Methanogenen (z. B. Mensch, Rind, Termiten). Hier findet ein unvollständiger Abbau organischer Substanzen statt, da Zwischenprodukte wie z. B. freie Fettsäuren vom Tier für seine Ernährung absorbiert werden. Hier spielt die Methanbildung aus Wasserstoff und Kohlendioxid eine übergeordnete Rolle. Das dritte Ökosystem umfasst Habitate wie z. B. heiße Quellen, in denen die Methanogenese in Abwesenheit von organischer Substanz mit Wasserstoff stattfindet, der beim Ablauf geologischer Prozesse entsteht. In Tabelle 1 sind

die thermophilen Spezies innerhalb der Gruppe der Methanogenen zusammenfassend aufgelistet.

Methanotrophe Organismen stellen eine Gruppe gramnegativer Bakterien dar, die taxonomisch, in Abhängigkeit ihres Membranaufbaus, in Typ I und Typ II Methanotrophe eingeteilt werden. Die Typ I Methanotrophen können auf Grund ihrer 16S rRNA den γ -*Proteobacteria* zugeordnet werden, wobei die Typ II Methanotrophen zu den α -*Proteobacteria* zählen. Sie kommen überall dort vor, wo Methan in die oxischen Bereiche der Biosphäre gelangt und können dieses als einzige Energie- und Kohlenstoffquelle nutzen. Dunfield *et al.* (2007) beschreiben weiterhin einen extrem acidophilen methanverwertenden Organismus aus dem Phylum der *Verrucomicrobia*. Dieser Methanotrophe wurde aus dem Boden eines geothermalen Areals in Neuseeland isoliert und ist vermutlich nur ein Vertreter einer sehr viel diverseren Gemeinschaft von methanotrophen *Verrucomicrobia*, die in Habitaten mit pH-Werten unter 5 für die Oxidation von Methan verantwortlich sind.

Zahlreiche Studien haben in Bezug auf die Oxidation atmosphärischen Methans durch Methanotrophe in Wiesenböden (Minami *et al.*, 1993), Waldböden (Stuedler *et al.*, 1989) oder auch Wüstenböden (Striegl *et al.*, 1992) ergeben, dass auch geringe Methanmischungsverhältnisse von bis zu 1,7 ppmv von diesen Mikroorganismen oxidiert werden können. Messungen der Methanaufnahmeraten ergaben zwei Kinetiken welche zur Unterscheidung von zwei Gruppen führten, den hoch und den niedrig affinen Methanotrophen (Bender und Conrad, 1992). Methanotrophe in Oberflächenböden und oxischen Rhizosphärenböden aus Feuchtgebieten, die hohen Konzentrationen an Methan ausgesetzt sind, zeigen überwiegend niedrige Affinitäten zum Substrat Methan (Bender und Conrad, 1993; Dunfield und Knowles, 1995), während methanotrophe Bakterien in oxischen Böden hohe Affinitäten besitzen (Bosse und Frenzel, 1997). Oxische Böden, wie z. B. die des Regenwaldes, fungieren über die hoch affinen methanotrophen Bakterien als Nettosenke für atmosphärisches Methan (Seiler *et al.*, 1984). Welche methanotrophen Bakterien für die Oxidation atmosphärischen Methans in diesen Böden verantwortlich sind, war lange unklar. Alle kultivierten Methanotrophen zeigten weitaus niedrigere Affinitäten zum Substrat. Die K_m -Werte (Halbsättigungs-Konstante) der bekannten Methanotrophen lagen ein bis drei Zehnerpotenzen höher als die K_m -Werte für die Oxidation von atmosphärischem Methan in oxischen Oberflächenböden. Reinkulturen konnten keine längeren Perioden bei atmosphärischen Methankonzentrationen überleben (Schnell und King, 1995). Spätere Studien zeigten, dass die Affinität wahrscheinlich mit

den Wachstumsbedingungen variiert, und Mitglieder der *Methylosinus/Methylocystis* Gruppe zur Oxidation von Methan in Böden beitragen (Dunfield und Conrad, 2000). Zusätzlich konnte über die Verwendung des *pmoA*-Gens als funktioneller Marker für die molekulare Charakterisierung von Methanotrophen eine neue Gruppe von hoch affinen Methanotrophen entdeckt werden (Bourne *et al.*, 2001; Henckel *et al.*, 2000). Das sogenannte „upland soil cluster alpha“ (USC α) kommt überwiegend in sauren Böden mit pH- Werten < 6 vor und ist phylogenetisch nah verwandt mit der Spezies *Methylocapsa acidiphila* (Ricke *et al.*, 2005). Eine weitere aktuelle Studie beschreibt neben der Oxidation von atmosphärischem Methan durch *Methylocystacea* in Waldböden die Methanoxidation durch Mitglieder der *Beijerinckiaceae* (Lau *et al.*, 2007).

Neben der aeroben Oxidation von Methan ist auch die anaerobe Methanoxidation (AOM) ein weit verbreitetes und geochemisch gut dokumentiertes Phänomen (Martens und Berner, 1977). Identität, Physiologie und Biochemie der verantwortlichen Mikroorganismen waren jedoch lange ungeklärt. Neuere Studien zeigen anaerobe Methanoxidation in marinen Sedimenten (Heijs *et al.*, 2007; Pancost *et al.*, 2000), wo enorme Mengen an Methan in kristalliner Form als Gashydrat oder freies Gas lagern. Für die AOM sind hier unterschiedliche Gruppen von *Archaea* verantwortlich, die als ANME Gruppen („anaerobic methane oxidizers“) bezeichnet werden. Die ANME-2 *Archaea* oxidieren das Methan in Konsortien mit sulfatreduzierenden Bakterien (Boetius *et al.*, 2000). Hier sind ANME-2 Zellaggregate von einem Mantel aus *Desulfosarcina* spp. umgeben und scheinen eine Art „umgekehrte Methanogenese“ zu vermitteln, wobei die *Desulfosarcina* spp. die Oxidation unvollständig oxidierteter Nebenprodukte wie z. B. Wasserstoff und Acetat an die Reduktion von Sulfat koppeln. Die ANME-1 *Archaea* scheinen weniger abhängig von einem eng assoziierten bakteriellen Partner zu sein und sind auch auf Einzelzellniveau zur Methanoxidation fähig (Orphan *et al.*, 2002). Die dritte Gruppe der ANME-3 *Archaea* kommen als Einzelzellen vor, als Konsortien mit *Desulfobulbus* spp., sowie als Aggregate mit einem bisher unidentifiziertem bakteriellen Partner. Alle drei ANME Gruppen sind verwandt mit Spezies von methanogenen *Archaea*. Kürzlich wurde ein weiteres Konsortium aus methanotrophen *Archaea* und einem Bakterium, welches ein Phylum repräsentiert von dem bisher keine kultivierten Isolate vorliegen, beschrieben. Diese Mikroorganismen sind fähig die anaerobe Methanoxidation an die Denitrifikation von Nitrat zu koppeln (Raghoebarsing *et al.*, 2006).

Der Methanfluss aus methanogenen Systemen wird somit auch durch die methanotrophen Bakterien beeinflusst und durch die Summe der Methanproduktionsrate und

Methanoxidationsrate bestimmt. Im Reisfeldboden wird während der Passage durch die oxischen Zonen in der Oberflächenschicht und in der Rhizosphäre bis zu 97 % des gebildeten Methans durch methanotrophe Mikroorganismen oxidiert, bevor es in die Atmosphäre gelangen kann (Krüger *et al.*, 2000). Durch anaerobe Oxidation von Methan durch *Archaea* und mit ihnen vergesellschafteten Bakterien (s.o.) werden 5-20 % des Netto-Methanflusses aus ozeanischen Sedimenten in die Atmosphäre verhindert (Valentine und Reeburgh, 2000).

Seit der vorindustriellen Zeit hat sich die Methankonzentration in der Atmosphäre mehr als verdoppelt. Während sie bis vor 200 Jahren mit ca. 0,7 ppmv noch konstant war (Heyer, 1990), ist sie bis heute auf etwa 1,8 ppmv (IPCC, 2007) angestiegen und steigt stetig weiter. Als indirekte Ursache für die Zunahme der Methankonzentration in der Atmosphäre wird die steigende Weltbevölkerung gesehen, die unter anderem eine Ursache für die Ausdehnung der Methanquellen ist. Der Mehrbedarf an Nahrungsmitteln führt zu einer Vergrößerung der Rinderbestände und der Reisanbauflächen. Bis zum Jahr 2020 ist z. B. eine Ausweitung der Reisproduktion um ca. 65 % zu erwarten (Neue, 1997) und somit ist mit einer erheblich erhöhten Methanemission aus Reisfeldern zu rechnen. Ebenfalls werden die Methanemissionen aus Mülldeponien erhöht, da sich deren Flächen im Zuge der zunehmenden Bevölkerungszahlen ausdehnt. Zusätzlich steigt durch die intensivere landwirtschaftliche Nutzung die Beanspruchung der Böden. Mechanische Bearbeitung, Düngung und Aufbringen von Pflanzenschutzmitteln und Pestiziden verringern die Aufnahme atmosphärischen Methans durch methanotrophe Bakterien im Boden (Hütsch, 1998; s.u.). So nehmen anthropogene Aktivitäten direkt und indirekt einerseits Einfluss auf die Methanquellen und andererseits auf die biogenen Senken für Methan.

1.2 Thermophile methanogene *Archaea*

Thermophile Methanogene (Tabelle 1) werden nicht ausschließlich in heißen Umwelten wie Ölfeldern, thermophilen Klärschlämmen, hydrothermalen Spalten in der Tiefsee oder ozeanischen Sedimenten gefunden (Jeanthon, 2000, Orphan *et al.*, 2000; Sekiguchi *et al.*, 1998). Sie scheinen auch in gemäßigten bzw. kalten Habitaten zu existieren. Yao und Conrad (2000) und Fey *et al.* (2001) detektierten Methanproduktion in Reisfeldboden bei Inkubationstemperaturen von 50 °C. Wu *et al.* (2005) zeigten, dass auch Uferböden als Habitat für thermophile Methanogene dienen. Nozhevnikova *et al.* (1997) beschrieben in

Sedimentproben aus kalten, tiefen Seen Methanproduktion bei einer Inkubationstemperatur von 70 °C.

Neben den gut untersuchten vorwiegend anoxischen Habitaten wie Reisfeldeböden und Torfmooren werden Methanogene auch in sogenannten oxischen Böden gefunden. Gattinger *et al.* (2007) stellten fest, dass thermophile Spezies der Gattung *Methanoculleus* und *Methanosarcina* durch Düngung mit Rindermist in Ackerböden eingetragen wurden und dort auch überdauerten. Ferner schloss die Arbeitsgruppe aus ihren Ergebnissen auf ein permanentes Vorhandensein von *Methanosarcina* sp. in oxischen Böden, auch ohne vorherige Düngung mit Mist.

Die Persistenz thermophiler Methanogener in Habitaten wie gemäßigten, überwiegend oxischen Böden ist nicht nur aus Gründen der dort herrschenden niedrigen Temperaturen verwunderlich, sondern auch, weil die eigentlich strikt anaeroben Organismen in dieser Umwelt Sauerstoff ausgesetzt sind. Auf Grund fehlender bekannter Überdauerungsstadien wie Zysten oder Sporen in der gesamten Klasse der Methanogenen muss man von anderen Mechanismen zur Überdauerung ausgehen. Ein Überleben kann auf die Bildung von anaeroben Mikronischen in den Böden oder durch die Aktivität schützender Enzyme, wie der Superoxiddismutase und Katalase (Brioukhanov *et al.*, 2002; Brioukhanov *et al.*, 2001; Kirby *et al.*, 1981), zurückzuführen sein (Chaban *et al.*, 2006).

Bis heute ist relativ wenig über die Ursachen und Mechanismen dieser weiten Verbreitung von thermophilen Organismen in gemäßigten bis hin zu kalten Habitaten bekannt. Der Eintrag von thermophilen Mikroorganismen über die Luft aus z.B. vulkanischen, geothermalen oder hydrothermalen Regionen könnte eine Erklärung für das Vorkommen sein (Bonjour *et al.*, 1988).

Tabelle 1
 Überblick über die thermophilen methanogenen Spezies innerhalb des Phylums der Euryarchaeota (Garry und Holt, 2001; www.dsmz.de).

Familie	Gattung	Spezies	Typstamm DSM Nr.	Acc. Nr. des 16S rRNA-Gens	Isoliert aus	Optimale Wachstums- temperatur	Verwertete Substrate
<i>Methanobacteriaceae</i>	<i>Methanothermobacter</i>	<i>M. thermoautotrophicus</i>	DSM 1053 ^T	X68720	<i>anaerobe Biogasanlage, heiße Quelle</i>	65 °C	H ₂ /CO ₂ , (Formiat)
		<i>M. defluvii</i>	DSM 7466 ^T	X99046	<i>Klärschlamm, Vergärungsanlage</i>	60 °C	H ₂ /CO ₂ , Formiat
		<i>M. marburgiensis</i>	DSM 2133 ^T	X15364	<i>Methacrylsäure haltiger Abfälle</i>	65 °C	H ₂ /CO ₂
		<i>M. thermoflexus</i>	DSM 7268 ^T	X99047	<i>mesophiler Klärschlamm</i>	55 °C	H ₂ /CO ₂ , Formiat
		<i>M. thermophilus</i>	DSM 6529 ^T	X99048	<i>Vergärungsanlage</i>	60 °C	H ₂ /CO ₂
		<i>M. wolfeii</i>	DSM 2970 ^T	X89406	<i>Methacrylsäure haltiger Abfälle</i>	60 °C	H ₂ /CO ₂
<i>Methanothermaceae</i>	<i>Methanothermus</i>	<i>M. fervidus</i>	DSM 2088 ^T	M59145	<i>thermophiler Methantank</i>	60 °C	H ₂ /CO ₂
		<i>M. sociabilis</i>	DSM 3496 ^T	AF095273	<i>Klärschlamm, Flusssediment</i>	83 °C	H ₂ /CO ₂
<i>Methanococcaceae</i>	<i>Methanothermococcus</i>	<i>M. thermolithotrophicus</i>	DSM 2095 ^T	M59128	<i>heiße schwefelige Quelle</i>	88 °C	H ₂ /CO ₂
		<i>M. okinawensis</i>	DSM 14208 ^T	AB057722	<i>schwefeliges Schlammloch</i>	65 °C	H ₂ /CO ₂ , Formiat
<i>Methanocaldococcaceae</i>	<i>Methanocaldococcus</i>	<i>M. jannaschii</i>	DSM 2661 ^T	M59126	<i>erhitzter Küstensand</i>	65 °C	H ₂ /CO ₂ , Formiat
		<i>M. infernus</i>	DSM 11812 ^T	AF025822	<i>hydrothormaler Tiefseeschlot</i>	80-85 °C	H ₂ /CO ₂
		<i>M. fervens</i>	DSM 4213 ^T	AF056938	<i>hydrothormaler Tiefseeschlot</i>	85 °C	H ₂ /CO ₂
		<i>M. indicus</i>	DSM 15027 ^T	AF547621	<i>hydrothormaler Tiefseeschlot</i>	85 °C	H ₂ /CO ₂
		<i>M. vulcanicus</i>	DSM 12094 ^T	AF051404	<i>hydrothormaler Tiefseeschlot</i>	80 °C	H ₂ /CO ₂
	<i>Methanotorris</i>	<i>M. igneus</i>	DSM 5666 ^T	M59125	<i>hydrothormaler Tiefseeschlot</i>	85 °C	H ₂ /CO ₂
		<i>M. formicicus</i>	DSM 16983 ^T	AB100884	<i>marines hydrothermales System</i>	70 °C	H ₂ /CO ₂ O ₂ , Formiat
<i>Methanomicrobiaceae</i>	<i>Methanoculleus</i>	<i>M. thermophilicus</i>	DSM 2373 ^T	AB065297	<i>"black smoker-Schornstein"</i>	55 °C	H ₂ /CO ₂ , Formiat
<i>Methanosarcinaceae</i>	<i>Methanosarcina</i>	<i>M. thermophila</i>	DSM 1825 ^T	M59140	<i>Abflusskanal eines Atomkraftwerks</i>	50 °C	Acetat, Methylamin, Methanol
	<i>Methanohalobium</i>	<i>M. evestigatum</i>	DSM 3721 ^T	U20149	<i>thermophiler Faulschlamm</i>	50 °C	Methylamin, Di- und Trimethylamin
	<i>Methanosalsum</i>	<i>M. zhilinae</i>	DSM 4017 ^T	k.A.	<i>Schlamm einer Salzlagune</i>	45 °C	Methylamin, Methanol
	<i>Methanomethylovorans</i>	<i>M. thermophila</i>	DSM 17232 ^T	AY672821	<i>Seesediment</i>	50 °C	Methanol, Di- und Trimethylamin
<i>Methanopyraceae</i>	<i>Methanopyrus</i>	<i>M. kandleri</i>	DSM 6324 ^T	M59932	<i>thermophiler Schlamm einer Biogasanlage</i>	98 °C	H ₂ /CO ₂
					<i>geothermal erhitztes Tiefseesediment</i>		

1.3 Kompostierung

Die Kompostierung ist definiert als ein mesophil beginnender, dann aber zunehmend thermophiler biologischer Prozess in technischem Maßstab. Der Ablauf der Kompostierung unter kontrollierten Bedingungen, wie Belüftung, Umsetzen und Bewässerung der Mieten, unterscheidet diesen Prozess von natürlichen Vorgängen wie Fäulnis oder Verwesung (Ryckeboer *et al.*, 2003). Durch eine entsprechende Prozessführung kann eine Verringerung des Gewichts, des Volumens und des Wassergehaltes erreicht und pathogene Mikroorganismen im kompostierten Material abgetötet werden (Hay und Kuchenrither, 1990).

Zur Anwendung kam die Kompostierung vermutlich bereits vor Christus im Römischen Reich und in China (Dunst, 1997). Schon vor 2000 Jahren beschrieb ein Römer in seinem Lehrbuch, wie landwirtschaftliche Abfälle vermischt, aufgesetzt, umgesetzt und dann als Bodenverbesserungsmittel eingesetzt wurden (Lex, 2002).

Im technischen Maßstab wird diese Art der Abfallverwertung in Deutschland erst seit den 1950er Jahren eingesetzt. Mit Einführung der Biotonne zur getrennten Sammlung von organischem Abfall in den 1980er Jahren erfuhr die Kompostierung ein intensives Wachstum (Bidlingmaier, 2000). So hat sich in den 1990er Jahren die Menge an getrennt gesammeltem Bioabfall versiebenfacht. Während z. B. 1995 4,1 mio t Bioabfälle (aus der Biotonne der Haushalte, Garten-, Park- und Marktabfälle) der biologischen Behandlung in Kompostierungs-, Vergärungs- bzw. Biogasanlagen zugeführt wurden, waren es 2003 schon rund 12,3 mio t behandelte Bioabfälle (Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit, www.bmu.de). Das Restmüllaufkommen kann so um bis zu 40 % reduziert werden (Hellmann, 1995), da Küchen- und Gartenabfälle mit 30-40 % mengenmäßig die bedeutendste Fraktion des Siedlungsabfallaufkommens ausmachen. Dies hat eine erhebliche Entlastung der üblich angewandten Abfallbeseitigungsverfahren wie der Verbrennung und der Deponierung zur Folge.

In Deutschland findet die Behandlung der gesammelten Bioabfälle in 1100 Anlagen statt (exklusive private Kompostierungsanlagen und landwirtschaftliche Biogasanlagen). Davon sind ca. 800 Kompostierungsanlagen (Gesamtkapazität 8,2 mio t Bioabfall) und 300 Vergärungsanlagen. Insgesamt unterliegen 487 dieser Anlagen der vom Deutschen Institut für Gütesicherung und Kennzeichnung e.V. kontrollierten Gütesicherung (420 Kompostierungsanlagen und 67 Vergärungsanlagen; Bundesgütegemeinschaft Kompost e.V., www.kompost.de). Im Wesentlichen werden in diesen Anlagen fünf Hauptverfahren für die Kompostierung unterschieden:

1. Offene oder gekapselte Mietenkompostierung, 2. Zeilen- und Tunnelkompostierung, 3. Trommelkompostierung, 4. Boxen- und Containerkompostierung, 5. Brikollarekompostierung (Wiemer und Kern, 1993).

Wie man von der etymologischen Abstammung des Wortes „Kompostierung“ ableiten kann (lateinisch „componere“ – zusammenlegen, zusammensetzen), wird zu Beginn des Prozesses eine Mischung unterschiedlicher organischer Abfälle zu Mieten aufgesetzt. Das zu kompostierende Material besteht hauptsächlich aus Grünschnitt und Küchenabfällen, in manchen Fällen auch aus Industrieabfällen und Klärschlamm. Um aerobe Abbauprozesse zu fördern, wird meist strukturschwaches Material (z. B. Küchenabfälle) mit strukturreichem Material (Grünschnitt) gemischt (Bratek, 2005). Chemisch gesehen setzt sich das Ausgangsmaterial dann hauptsächlich aus Cellulose, Hemicellulose und Lignin zusammen. Durch die Küchenabfälle werden außerdem Stärke, freie Zucker, Aminosäuren, Fettsäuren und folglich auch Proteine und Fette der Kompostierung zugeführt.

Unter optimalen Bedingungen kann der Kompostierungsprozess theoretisch in vier durch die Temperatur bestimmte Phasen eingeteilt werden: mesophile Phase, thermophile Phase, Abkühlphase und Reifephase. In der Praxis kommt es zu Überschneidungen der Temperaturphasen auf Grund von Temperaturgradienten im Material und unterschiedlichen Temperatureffekten auf die Mikroorganismen (Fogarty und Tuovinen, 1991).

In der initialen mesophilen Phase (10 °C-42 °C) findet eine Ansäuerung des Materials durch Ansammlung organischer Säuren statt, die während der schnellen Abbauprozesse auch schon vor der Anlieferung des Materials in die Anlage entstehen (Hellmann *et al.*, 1997). Diese Phase geht nach mehreren Stunden oder einigen Tagen in die thermophile Phase der Kompostierung über. Durch Freisetzung von Wärmeenergie aus dem mikrobiellen Stoffwechsel kann es zu einer Erhöhung der Mientemperatur bis auf 82 °C kommen (Miller, 1992; De Bertoldi und Zucchoni, 1987). Die Selbsterhitzung ist abhängig von der Abbaubarkeit und dem Energiegehalt der Substrate, dem Wassergehalt und der Wärmeleitfähigkeit des Materials sowie der Sauerstoffverfügbarkeit (Haug, 1993). Die hohen Temperaturen sind aus Gründen der Abtötung pathogener Mikroorganismen und der Reduzierung von Viren und keimfähigen Pflanzensamen, der sogenannten „Hygienisierung“, erwünscht und werden als Qualitätskriterium gefordert (Lott Fischer *et al.*, 2001). In dieser Phase werden hauptsächlich Polymere wie Cellulose, Hemicellulose und Proteine abgebaut. Sie dauert je nach eingesetztem Ausgangsmaterial mehrere Tage,

einige Wochen (z. B. Lebensmittelabfälle) oder sogar Monate (z. B. Holzabfälle; Ryckeboer *et al.*, 2003). Bei einer guten Prozessführung dauert die thermophile Phase solange an, bis die Wärmeabfuhr auf Grund des Verbrauchs an leicht abbaubaren Substanzen geringer ist als die Wärmeabfuhr aus dem Material. Dies führt zur Einleitung der zweiten mesophilen Phase, der Abkühlphase, in der eine Rekolonisierung des Komposts mit mesophilen Mikroorganismen stattfindet. Die vierte und letzte Phase der Kompostierung ist die Reifephase. Sie dauert einige Wochen bis Monate (Insam und de Bertoldi, 2003; Hoitink und Boehm, 1999), wobei Verbindungen wie z. B. Lignin-Humus-Komplexe entstehen, die nicht weiter abbaubar sind. Die Einteilung der Komposte erfolgt in Form von „Rottegraden“. Sie beschreiben den Fortschritt des Abbaus auf der Basis des Selbsterhitzungspotentials des verbliebenen Kompostmaterials unter definierten Bedingungen. Rottegrad I beschreibt Frischkomposte und Rottegrad V kennzeichnet voll gereiften Kompost. Frischkomposte sind hygienisiert, aber noch nicht voll ausgereift und enthalten höhere Anteile an leicht abbaubarer organischer Substanz. Damit stellt der Frischkompost für die Pflanzendüngung wichtige Nährstoffe bereit. Er wird vorwiegend in der Landwirtschaft eingesetzt. Fertigkomposte enthalten mehr stabile Huminstoffe, die zur Bodenverbesserung beitragen. Fertige Komposte werden im Landschafts- und Gartenbau, aber auch in der Landwirtschaft eingesetzt.

Heute werden jährlich ca. 4 mio t Komposte und Gärrückstände in Deutschland erzeugt und als wertvolle Bodenverbesserungs- und Düngemittel vorwiegend in der Landwirtschaft eingesetzt (Landwirtschaft 48 %, Landschaftsbau 12 %, Hobbygarten 12 %, Erdenwerke 14 %, Rest 14 %; Angaben für 1998/99, Bundesgütegemeinschaft Kompost e.V., www.kompost.de). Für die nachhaltige Bewirtschaftung von Acker- und Wiesenflächen hat die Düngung mit Kompost eine besondere Relevanz, da durch den gezielten Einsatz chemische Dünger eingespart werden können. Laut der Bioabfallverordnung (www.bmu.de) ist es erlaubt, maximal 30 t Trockenmasse Kompost pro Hektar innerhalb von drei Jahren aufzubringen. Der Kompost wird mit einem Miststreuer oder einem speziellen Kompoststreuer auf die Felder aufgebracht und möglichst oberflächennah eingearbeitet.

Neben den positiven Effekten der Kompostdüngung auf Bodenstruktur (Barzegar *et al.*, 2002) und Bodenfruchtbarkeit (Filcheva und Tsadilas, 2002) beeinflusst diese Art der Düngung auch die Struktur der mikrobiellen Gemeinschaft in den Böden und die Diversität. Innerebner *et al.* (2006) zeigten mittels DGGE-Analysen, dass nach

Kompostdüngung ein deutlicher Unterschied in der Struktur der Gemeinschaft von Ammoniumoxidierern im Boden zu detektieren war. Ros *et al.* (2006 a und b) bestätigten dies und stellten fest, dass nach Zusatz von Kompost die Diversität von Bakterien und speziell die der Ammoniumoxidierer, im Vergleich zum Kontrollboden erhöht war. Die im Kompost detektierte Bakteriengemeinschaft spiegelte sich nicht in der Population der gedüngten Böden wider. Saison *et al.* (2005) beschrieben nach Kompostzusatz zu einem Boden eine Erhöhung der mikrobiellen Aktivität und Populationsgröße und eine Veränderung der Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaft. Jede dieser zitierten Studien betont, dass es sich vermutlich nicht um Effekte handelt, die auf einen Eintrag der Kompost getragenen Mikroorganismen zurückzuführen sind. Vielmehr wird angenommen, dass die Kompostmikroorganismen schnell verdrängt sind, und die langfristigen Veränderungen in der mikrobiellen Bodengemeinschaft durch den Eintrag der Kompostmatrix an sich, und somit durch einen erhöhten Gehalt an organischer Substanz hervorgerufen werden (Saison *et al.*, 2005).

1.3.1 Methan und Kompostierung

Durch natürliche oder technische Belüftung sowie durch regelmäßiges Umsetzen der Kompostmieten sollen oxische Bedingungen hergestellt werden. Sie gewährleisten aerobe Abbauprozesse während der Kompostierung und sind für eine Aufrechterhaltung der hohen Temperaturen verantwortlich. Diese kontrollierte Prozessführung soll neben ihrer eigentlichen Aufgabe, der Optimierung des Rotteprozesses, Methanemissionen aus Kompostierungsanlagen vermindern. Insgesamt wird die Kompostierung als eine Möglichkeit beschrieben, die Methanemissionen aus Mülldeponien zu verringern (Fritz *et al.*, 2001; Ayalon und Avnimenelech, 2001). Dennoch wurden in unterschiedlichen Studien Methanemissionen aus Kompostmieten gemessen (u.a. Hao *et al.*, 2001; Beck-Friis *et al.*, 2000; Hellebrand, 1998; Lopez-Real und Baptista, 1996; Hellmann, 1995). Vereinzelt konnten sogar Emissionen von bis zu $119 \text{ g CH}_4 \text{ m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ beobachtet werden, die den Methanemissionen aus Mülldeponien entsprechen. Die Emissionen von Methan aus den Mieten sind abhängig von der Mietendimension (Beck-Friis *et al.*, 2000), der Dichte des Materials (Sommer und Möller, 2000), der Zusammensetzung des Ausgangsmaterials (He *et al.*, 2000) und der methanotrophen Aktivität (Jäckel *et al.*, 2005). Auf der Basis begrenzter Datensätze wurden die Methanemissionen aus Kompostierungsanlagen in Deutschland auf $7,4 \times 10^6 \text{ t CH}_4 \text{ a}^{-1}$ geschätzt. Diese Menge würde 0,44 % der Gesamtemission von Methan pro Jahr entsprechen (Hellmann, 1995).

Die Prozesse und die Mikroorganismen, die für die Methanproduktion im Habitat Kompost verantwortlich sind, wurden bisher noch nicht im Detail untersucht. Derikx *et al.* (1989) fanden 2×10^8 thermophile Methanogene g-TG⁻¹ in Champignonkompost. Davon wurde ein Isolat als Vertreter von *Methanobacterium thermoautotrophicum* identifiziert. Hellmann *et al.* (1997) stellten über die Analyse des Fettsäuremusters mittels der PLFA-Methode zudem fest, dass die Zunahme von methanogenen *Archaea* mit dem Anstieg der Methanemission aus Kompost korrelierte. Im Gegensatz dazu kamen Cahyani *et al.* (2004) nach Beobachtung der Sukzession von *Archaea* während der Kompostierung von Reisstroh mittels DGGE zu dem Schluss, dass keine Methanogenen während der thermophilen Phase wachsen. Beck-Friis und seine Mitarbeiter (2003) zeigten allerdings, dass Methan nur in der thermophilen Phase eines Kompostierungsprozesses gebildet wurde.

1.4 Ziele der Arbeit

Das Ökosystem Kompost stellt aus mikrobiologischer Sicht ein vielfältiges Habitat dar, in dem die Analyse der methanogenen Prozesse und der daran beteiligten Mikroorganismen noch an ihrem Anfang steht.

Seit der Antike wird Kompost in der Landwirtschaft als Bodenverbesserer eingesetzt, jedoch ist kaum etwas über den Eintrag von den aus Kompost stammenden Mikroorganismen in den gedüngten Boden und ihrer dortigen Persistenz bekannt.

Um einen besseren Überblick über die thermophile methanogene Population in Kompostmaterial und über deren Verbreitung in andere Habitats zu bekommen, sollen in dieser Arbeit unter anderem durch Anwendung molekularer Methoden neue Erkenntnisse erlangt werden:

- Wie setzt sich die methanogene Population in Kompost zusammen?
- Sind thermophile methanogene *Archaea* ein fester Bestandteil der Mikroorganismen-Population während Kompostierungsprozessen?
- Welche Faktoren beeinflussen die Methanogenese in Kompostmaterial?
- Können thermophile Methanogene über die Luft oder die Düngung mit Kompost in gemäßigte Böden eingetragen werden, und wie lange können sie dort überdauern?
- Sind thermophile Methanogene ubiquitär in gemäßigten, überwiegend oxischen Böden vorhanden?

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Gase

Alle Chemikalien wurden, sofern nicht anders vermerkt, von folgenden Firmen bezogen:

- Fluka Biochemika, Buchs, Schweiz
- Invitrogen, Leek, Niederlande
- Fermentas, St. Leon Rot
- Merck, Darmstadt
- Riedel de Haen, Seelze
- Roth, Karlsruhe

Alle Gase stammten von den Firmen:

- Messer, Krefeld
- Air Liquide, Düsseldorf

Folgendes Wasser wurde für die Analysen eingesetzt:

- PCR-Wasser: DNase- und RNase-frei (Invitrogen, Holland)
- Reinstwasser: aus der institutseigenen Anlage (ELGA Labwaters, Purelab Plus, Siershahn)
- Anoxisches Wasser: Reinstwasser mit Stickstoff unter starkem Blubbern begast

2.2 Proben

Die im Anschluss beschriebenen Materialien (Böden, Komposte, Mist) wurden für alle folgenden Untersuchungen verwendet. Die unterschiedlichen Herkunftsorte sind mit Abkürzungen versehen, die in der gesamten Arbeit als Bezeichnung der Proben beibehalten werden.

2.2.1 Kompostierungsanlagen, Komposte und Mist

Anlage CC (Abbildung 1)

Das Material für den Hauptteil der Versuche wurde von einer kommunalen Kompostierungsanlage bezogen, die nach dem Prinzip der offenen Mietenkompostierung arbeitet (Tabelle 2). Der angelieferte Grünschnitt und die Bioabfälle werden in einem Verhältnis von ca. 1:3,5 gemischt und anschließend bei niedriger Drehzahl geschreddert. Dieses Rotteausgangsgemisch wird auf Mieten aufgesetzt (6 m breit, 2,80 m hoch, 36 m lang), welche die ersten 3-4 Wochen der Rotte mit einer GORE™-Cover Membran abgedeckt sind (Abbildung 1A). Während dieser „Intensivrotte“ werden die Mieten je nach Bedarf druckbelüftet. Die anschließende 6-8 wöchige Nachrotte erfolgt als offene Mietenkompostierung (Abbildung 1B). Hier werden die Mieten (3 m breit, 1,80 m hoch, 30 m lang) wöchentlich mit einem Mietenumsetzer durchmischt und der Wassergehalt bei Bedarf nachreguliert. Zur Endabsiebung werden unterschiedliche Trommelsiebe mit Maschenweiten von 0 bis 20 mm eingesetzt. Die Siebreste werden von Fremdstoffen gereinigt und als Strukturmaterial für neue Mieten verwendet. Die Qualitätskontrolle des Fertigkomposts mit dem Rottegrad V unterliegt der Bundesgütegemeinschaft Kompost. Der Kompost wird für den Landschaftsbau, die Landwirtschaft und zur Weiterverarbeitung zu Substraterden genutzt.



Abbildung 1

Mit GORE®-Cover abgedeckte Miete während der Intensivrotte (A) und Mieten während der Nachrotte (B) auf der Anlage CC.

Anlagen NC, AC, TC, HC, SC, MC und UC (Abbildung 2)

Bei den Anlagen NC, AC und TC handelt es sich um große, von verschiedenen Betreibern betreute Kompostierungsanlagen, mit unterschiedlichen Prozessführungen (Tabelle 2). TC war hier die einzige Anlage, die Frischkomposte herstellt (Rottedauer ca. 2 Wochen), die

für den landwirtschaftlichen Gebrauch zur Verfügung stehen. Die Anlagen HC, SC, MC und UC unterhalten nur ein bis zwei große Mieten, die weniger intensiv prozessiert werden (Tabelle 2). Bei dem eingesetzten Material handelt es sich ausschließlich um Grünschnitt, der von privaten Anlieferern stammt.



B



Abbildung 2
Mieten der Kompostierungsanlagen HC (A) und SC (B).

Kompostmieten PC und GC

Das Kompostmaterial PC stammte von einem landwirtschaftlichen Betrieb mit angeschlossenem Reitstall. Das Material GC stammt von einem häuslichen Komposthaufen (Tabelle 2). Beide Kompostierungen werden rein privat betrieben.

Pferdemist PA und PS

Der frische Pferdeapfel PA stammte von einer jungen Stute aus einer privaten Pferdehaltung auf einer Koppel mit Unterstand. Aus dieser Haltung wurde auch der ca. 1,5 Jahre alte, durchgerottete Pferdemist PS bezogen. Der Misthaufen war 1,5 m hoch und bestand aus Pferdeäpfeln, Einstreu und Heuresten.

Tabelle 2
Übersicht der beprobten Komposte.

Abkürzung	Quelle	Rotteausgangsmaterial	Prozessführung	Umsetzintervall	Kapazität (t/a)	Alter des fertigen Materials
CC	Kompostierungsanlage	1:3:5 Grünschnitt, Biomüll	Offene Mieten überdacht (erste 3-4 Wochen GORE™-Cover)	2-3 × /Woche	10000	11 Wochen
NC	Kompostierungsanlage	1:4 Grünschnitt, Biomüll	Tunnel-Kompostierung	2 × /Woche	20000	20 Wochen
TC	Kompostierungsanlage	Biomüll	Tunnel-Kompostierung	Nein	37000	12 Tage (Frischkompost)
AC	Kompostierungsanlage	Biomüll	Boxen-Kompostierung	Nein	30000	4 Wochen
HC	Kompostierungsanlage	Grünschnitt	Offene Mieten (nicht belüftet)	4 × /a	1200	1 Jahr
MC	Kompostierungsanlage	Grünschnitt	Offene Mieten (nicht belüftet)	4 × /a	1200	1 Jahr
UC	Kompostierungsanlage	Grünschnitt	Offene Mieten (nicht belüftet)	5 × /a	1200	2 Jahre
SC	Kompostierungsanlage	Grünschnitt	Offene Mieten (nicht belüftet)	5 × /a	1200	2 Jahre
GC	Komposthaufen (privat)	Küchenabfälle, Grünschnitt	Offene Mieten (nicht belüftet)	Nein	k.A.	1 Jahre
PC	Kompostmiete (privat)	Pferdemist, Stroh, Grünschnitt	Offene Mieten (nicht belüftet)	1 × /Monat	k.A.	8 Wochen

2.2.2 Komposte: Probennahme und übergreifende Probenaufbereitung

Wenn nicht anders vermerkt, wurde in einer Tiefe von 20-25 cm an drei unterschiedlichen Stellen (jeweils an beiden Enden und in der Mitte) der Miete Material entnommen (ca. 500 g). Diese drei Proben wurden anschließend in einem Eimer gut gemischt. Ein Teil dieser Mischprobe wurde dann in verschlossenen Plastikbehältern bei Umgebungstemperatur in das Labor transportiert. Bei den Kompostanlagen CC und NC wurden Mieten unterschiedlichen Alters beprobt, bei allen anderen wurden nur Proben von fertig gereiftem Kompost zur Untersuchung verwendet. Das Kompostmaterial wurde durch ein Edelstahlsieb mit einer Maschenweite von 4 mm abgesiebt, um gröbere Bestandteile zu entfernen und so eine bessere Struktur für die Weiterverarbeitung zu erzielen. Für alle Inkubationsversuche wurde das Kompostmaterial am Tag der Probennahme verarbeitet. Bis zur Untersuchung mittels molekularbiologischer Methoden wurde das Material in sterilen Falcon-Röhrchen (Greiner, Nürtingen) bei -20 °C gelagert.

2.2.3 Böden

Böden AK und A

Der mit Kompost gedüngte Acker (AK) gehört zu einem Agrarbetrieb, der gänzlich auf mineralischen Dünger und konventionelle Bodenbearbeitung wie das Pflügen verzichtet. Seit 2001 wurde der Boden mit 10 t reifem CC Kompost (Frischgewicht) pro Hektar und Jahr jeweils nach der Ernte gedüngt. Der Kompost wurde dabei ca. 10 cm tief in die oberste Bodenschicht eingebracht. Der angrenzende Acker, der konventionell - ohne Kompostdüngung - bearbeitet wurde, diente als Kontrollboden (Abbildung 3).



Abbildung 3

Ackerböden mit (AK, rechts im Bild) und ohne Kompostdüngung (Kontrolle, links im Bild), sowie die Serumfläschchen, die die anoxische Aufschlammung des jeweiligen Bodens beinhalten, welche für die Inkubationsexperimente zur potentiellen Methanbildung eingesetzt wurden.

Böden K1-3, B1-10, H 1-5, R1-5, M 1-3 und D 1-3

Für die Bodenproben K1-3, B1-10, H 1-5, R1-5, M 1-3 und D 1-3 sind die bekannten Parameter in Tabelle 3 zusammengefasst. Nähere Informationen über die Düngung sind nicht verfügbar, da die Proben zufällig, ohne genauere Kenntnisse von Bodenbearbeitung und Düngung genommen wurden.

Die mittels GPS erfassten Koordinaten der Probennahmepunkte (GPS SporTrak Map Magellan, Tales Navigation, San Dimas, CA) wurden mittels eines Geographischen Informationssystems an der Universität Mainz (Software ArcGIS Desktop 9.2) mit einer georeferenzierten Bodentypenkarte (Institut für Länderkunde Leipzig, 2003) überlagert, so dass die Bodentypenzugehörigkeiten der einzelnen Probennahmepunkte abgelesen werden konnten (Tabelle 3). Desweiteren wurde mit Hilfe der Koordinaten eine Übersichtskarte erstellt (Abbildung 4).

Tabelle 3

Details der Probennahme von Böden an 29 unterschiedlichen Standorten in Deutschland.

k.A.: keine Angaben; W-Weizen: Winterweizen; RPR: Lössgebiet: Rendzina und Pararendzina, Ranker, Podsol-Braunerde, Pelosol-Braunerde; PFP: Lössgebiet: Parabraunerde, Fahlerde, Pseudogley-Parabraunerde, Pseudogley; BPB: Lössgebiet: Braunerde, Podsol-Braunerde; TBP: Lössgebiet: Tschernosem-Braunerde bzw. Pararendzina; PBB: Lössgebiet: Podsol-Braunerde, podsolige Braunerde; AGG: Flusstal: Auenboden, Gley, Gley-Tschernosem; MKK: Küstenregion: Marschboden, Kleimarsch, Kalkmarsch; BPP: Flachland: Braunerde, Parabraunerde, Pararendzina; PPP: Flachland: Podsol-Braunerde, Podsol-Bänder-Parabraunerde, Pseudogley-Podsol; APB: Flachland/Alpenvorland: Parabraunerde, Braunerde, Pararendzina; FPB: Flachland: Parabraunerde, Braunerde, Pararendzina (löss-vermischt); PPB: Lössgebiet: Pseudogley, Parabraunerde-Pseudogley, Parabraunerde, Braunerde; ANT: Anthropogen verändert durch Siedlungsgebiete.

Probe	Datum	Ort	Quelle	Bodentyp	Frucht	Höhe	Kommentar
K1	26.02.2007	Hoyershausen	Acker	RPR	W-Weizen	139 m	mineralische Düngung
K2	"	Hoyershausen	Acker	RPR	W-Weizen	146 m	mineralische Düngung
K3	"	Hoyershausen	Wiese	PFP	Grünland	156 m	evtl. Kühe
B1	04.03.2007	Hahnstätten	Acker	BPB	W-Weizen	173 m	k.A.
B2	"	Flacht	Wiese	BPB	Grünland	123 m	feucht, neben Bach
B3	"	Holzheim	Acker	PFP	Raps	203 m	k.A.
B4	"	Dehrn	Wiese	TBP	Grünland	143 m	feucht, neben Bach
B5	"	Heckholzhausen	Wiese	PBB	Grünland	239 m	k.A.
B6	"	Löhnberg	Wiese	PBB	Grünland	205 m	feucht, neben Bach
B7	"	Solms	Acker	PBB	W-Weizen	183 m	k.A.
B8	"	Wetzlar	Acker	PBB	k.A.	294 m	frisch gepflügt
B9	"	Dudenhofen	Wiese	AGG	Grünland	205 m	k.A.
B10	"	Gießen	Wiese	AGG	Grünland	189 m	k.A.
H1	11.03.2007	Hamburg	Wiese	MKK	Grünland	13 m	Pferde
H2	"	Wedel	Acker	BPP	W-Weizen	11 m	k.A.
H3	"	Wedel	Acker	MKK	W-Weizen	0 m	Marsch
H4	"	Wedel	Acker	PPP	k.A.	13 m	frisch gepflügt
H5	"	Hamburg	Moor	PPP	k.A.	13 m	Moor
R1	11.03.2007	Bad Endbach	Acker	PBB	k.A.	330 m	k.A.
R2	"	Bad Endbach	Acker	PFP	k.A.	315 m	k.A.
R3	"	Bad Endbach	Wald	PBB	k.A.	326 m	k.A.
R4	"	Bad Endbach	Wiese	PBB	Grünland	305 m	k.A.
R5	"	Bad Endbach	Wiese	PBB	Grünland	355 m	k.A.
M1	21.03.2007	Markelfingen	Acker	APB	k.A.	415 m	frisch gepflügt
M2	"	München	Acker	FPB	k.A.	448 m	k.A.
M3	"	München	Wiese	FPB	Grünland	448 m	k.A.
D1	"	Dresden	Wiese	PPB	Grünland	200 m	k.A.
D2	"	Dresden	Wiese	ANT	Grünland	146 m	k.A.
D3	"	Dresden	Wiese	PPB	Grünland	210 m	k.A.

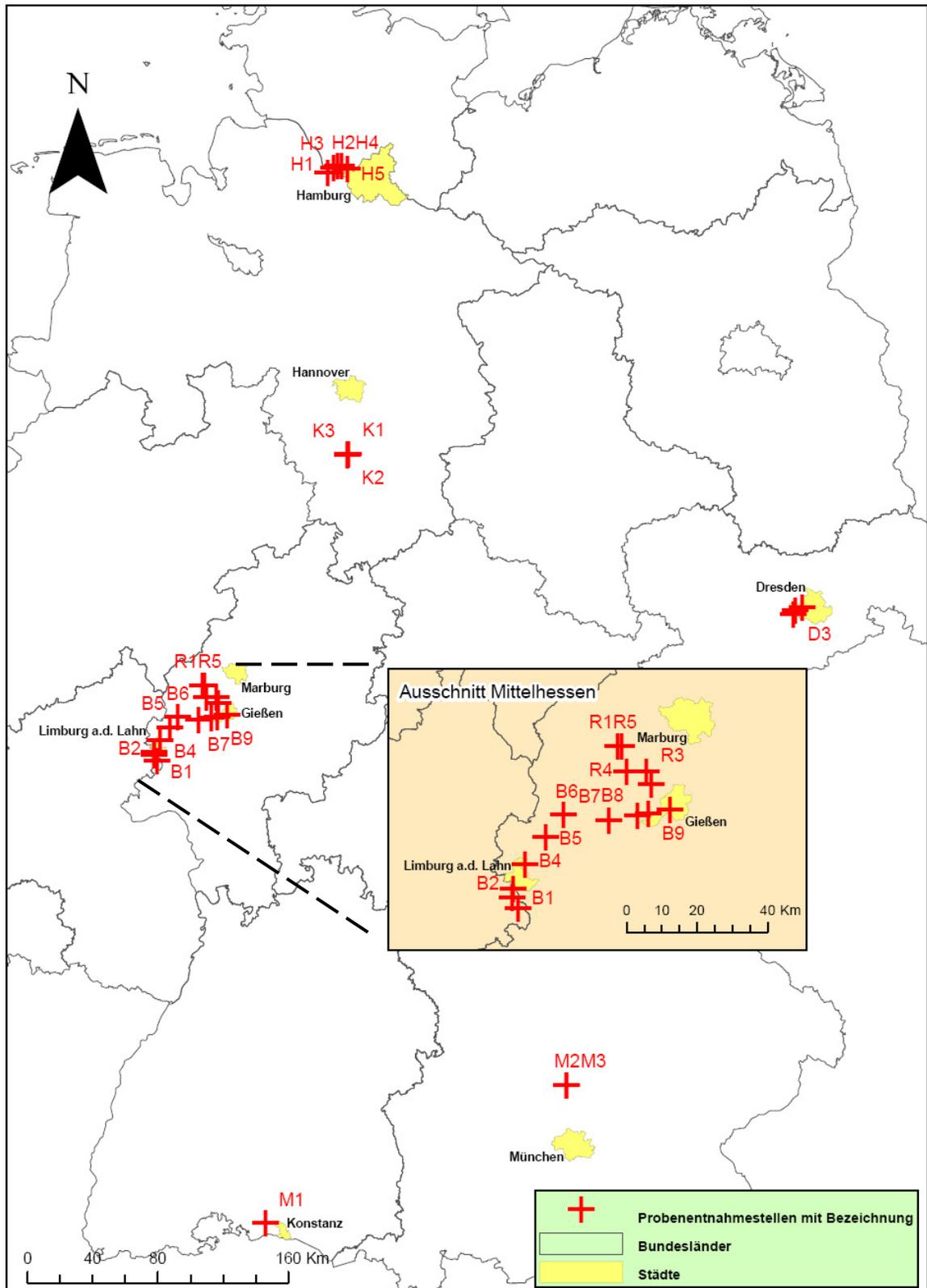


Abbildung 4
 Übersichtskarte Deutschlands mit Kennzeichnung der Probenentnahmestellen der Böden K1-3, B1-10, H 1-5, R1-5, M 1-3 und D 1-3 (siehe auch Tabelle 3).

Böden OWC, GIC, MIC, SSC und K (Linz, Österreich)

Die Bodenproben OWC, GIC, MIC, SSC und K stammten von einer Versuchsstation in der Nähe von Linz, Österreich, die seit 1991 ein Rotationsexperiment mit Mais, Sommerweizen und Wintergerste auf mit verschiedenen Komposten gedüngten Parzellen (10 m × 3 m, Abgrenzung durch Metallbleche) durchführt.

Die reifen Komposte wurden von Mieten unterschiedlicher Kompostierungsanlagen genommen. Die Parzellen wurden jeweils einmal jährlich im Frühjahr mit einer Menge an Kompost gedüngt, die 175 kg Stickstoffzufuhr pro Hektar entsprach. Folgende gedüngte Böden wurden verwendet:

- OWC: gedüngt mit Kompost von kommunalen Bioabfällen
- GIC: gedüngt mit Kompost von Grünabfällen (Laub, Gehölzschnitt, Gartenabfälle)
- MIC: gedüngt mit Kompost von Kuhmist und Stroheinstreu (inklusive flüssigem und festem Dung)
- SSC: gedüngt mit Kompost von anaerob stabilisiertem Klärschlamm einer kommunalen Kläranlage in Kombination mit Baumrinde und Hackspäne als Auflockerungsbestandteile.
- K: ungedüngter Boden

Durch Pflügen wurde das Material in den Boden eingearbeitet. Pro Hektar wurden zusätzlich 80 kg Stickstoff in Form von mineralischer Düngung (NH_4NO_3) supplementiert (Ros *et al.*, 2006b).

2.2.4 Böden: Probennahme und übergreifende Probenaufbereitung

Böden A, AK, K1-3, B1-10, H 1-5, R1-5, M 1-3 und D 1-3

Mit einem Bohrstock wurden je Standort Boden fünf Bodenkerne bis zu einer Tiefe von 10-15 cm genommen (Abbildung 5). Diese Bodenkerne wurden vereinigt, gut gemischt und in das Labor transportiert.

Böden OWC, GIC, MIC, SSC und K

Die Bodenproben aus Linz wurden von Brigitte Knapp vom Institut für Mikrobiologie der Universität Innsbruck genommen und in sterilen Falcon-Röhrchen verschickt. Die Aufarbeitung der Proben erfolgte spätestens zwei Tage (Greiner, Nürtingen) nach der

Probennahme. Je Bodenvariante wurde von zwei parallelen Parzellen Proben genommen (Bezeichnung a und b).

Für die Durchführung der chemischen Analysen wurden die Proben ungetrocknet verarbeitet. Bis zur Untersuchung mit molekularbiologischen Methoden wurden die Bodenmaterialien in sterilen Falcon-Röhrchen bei -20 °C gelagert.



Abbildung 5
Probennahme eines Bodenkernes mit Hilfe eines Bohrstockes.

2.3 Sammlung von luftgetragenen Mikroorganismen auf der CC Kompostierungsanlage mittels Filtration

Die Sammlung der Mikroorganismen erfolgte in Anlehnung an die VDI Richtlinie 4253 (Kommission Reinhaltung der Luft im VDI und DIN, 2004) auf Gelatinefiltern ($3\text{ }\mu\text{m}$ Porendurchmesser, $\varnothing\ 80\text{ mm}$; Sartorius, Göttingen). Die Filter wurden hierbei in der entsprechenden Stückzahl mit einer sterilen Pinzette auf je einen zuvor für 3 h bei 180 °C sterilisierten Aluminium-Filterhalter aufgebracht. Die Luft wurde mit Hilfe eines MD8 AirPort Filtrationssammlers (Sartorius, Göttingen) während des Umsetzungsvorganges der Kompostmieten in einer Höhe von 1,50 m durch den Filter gesaugt. Der Abstand zur Miete betrug dabei etwa 3 m.

Die Gelatinefilter, die für molekularbiologische Analysen verwendet wurden (Abschnitt 2.7.1.2), wurden am 8 Februar 2006 bei einer Luftfeuchtigkeit von 82 % und einer Windgeschwindigkeit von $1,8\text{ m s}^{-1}$ für 10 min bei einem Volumenstrom von $6\text{ m}^3\text{ h}^{-1}$ beaufschlagt (filtriertes Luftvolumen 1 m^3).

Durch die Gelatinefilter für die anschließenden Inkubationsversuche zur potentiellen Methanbildung (Abschnitt 2.5.7) wurden entsprechend $0,11\text{ m}^3$, $0,26\text{ m}^3$, $0,54\text{ m}^3$ und

1,07 m³ Luftvolumina filtriert. Diese Sammlung wurde am 13 September 2006 bei einer Luftfeuchtigkeit von 75 % und einer Windgeschwindigkeit von 1,2 m s⁻¹ durchgeführt.

2.4 Analytische Methoden

2.4.1 pH-Wert

Der pH-Wert der Proben (Kompost, Boden) wurde mittels des potentiometrischen Verfahrens bestimmt. Hierfür wurden zunächst 2 g frisches Material mit 20 ml einer 0,01 M CaCl₂-Lösung in Suspension gebracht. Die Suspensionen wurden dann für eine Stunde vertikal geschüttelt (Titramax 100, Heidolph, Schwabach). Nach einer weiteren halben Stunde der Sedimentation der Partikel wurde der pH-Wert im Überstand gemessen (pH-Temperatur-Einstabmesskette: Microprocessor pH535, Multical, Weilheim).

2.4.2 Gravimetrischer Wassergehalt und maximale Wasserhaltekapazität

(Schlichting und Blume, 1966)

Der Wassergehalt der Proben wurde gravimetrisch nach Trocknung bis zur Gewichtskonstanz bei 105 °C bestimmt.

Zur Bestimmung der maximalen Wasserhaltekapazität wurde die Probe in einen mit Nylontuch und Filterpapier verschlossenen Plastikzylinder gefüllt und über Nacht in ein mit Wasser gefülltes Behältnis gestellt, wobei der Füllstand des Wassers dem der Bodenfüllhöhe im Plastikzylinder entsprach. Nach anschließender Equilibrierung der Probe auf feuchtem Filterpapier wurde die Wasserhaltekapazität gravimetrisch bestimmt.

2.4.3 Bestimmung des Gehaltes an wasserlöslichem Kohlenstoff

Der wasserlösliche Kohlenstoff als Maßeinheit für leicht abbaubaren Kohlenstoff wurde jeweils von 30 g frischem Boden nach Burford und Bremner (1975) bestimmt. Nach Extraktion mit 60 ml Reinstwasser auf einem Horizontalschüttler, Zugabe von 10 ml Na₂SO₄-Lösung (4 %) als Flockungsmittel und anschließender Filtration, wurde ein Aliquot von 25 ml bei 80 °C über Nacht verdampft. Die Rückstände wurden in 9 ml konzentrierter H₂SO₄ und 5 ml 2 N K₂Cr₂O₇ aufgenommen und bei 120 °C für 90 min oxidiert. Nach dem Auffüllen auf 50 ml mit Reinstwasser wurden die Proben für 10 min bei 1630 g zentrifugiert (Labofuge, Heraeus, Hanau). Die Extinktion der reduzierten Cr³⁺

Ionen wurde anschließend photometrisch bei 578 nm bestimmt. Zum Vergleich wurde eine Standardkurve mit Natriumoxalat angefertigt.

2.4.4 Bestimmung des C/N-Verhältnisses und der Summe an C, N und S

Die Gehalte an Gesamtkohlenstoff, -Stickstoff und -Schwefel in den getrockneten Böden wurden mit Hilfe eines Elementar-Analysensystems (VarioMax V5.5, Hanau) ermittelt. Die Analyse fand als Auftragsarbeit am Institut für Pflanzenökologie der Universität Giessen statt.

2.4.5 Konzentrationsbestimmung organischer Säuren mittels HPLC

1 g Material wurde in ein 2 ml Reaktionsgefäß (Noras, Würzburg) eingewogen, mit 1 ml Reinstwasser versetzt, gut gemischt und 5 min bei 13817 g zentrifugiert (Tischzentrifuge, Micro 20, Hettich, Tuttlingen). Der Überstand wurde jeweils in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß (Noras, Würzburg) überführt, mit einer 1 ml Einwegspritze (Becton Dickinson GmbH, Heidelberg) aufgenommen und mit Hilfe einer Filtereinheit (2 RC, 0,2 µm, Spartan 30/0, Schleicher & Schuell, Dassel) filtriert. Mit Hilfe des automatischen Probenaufgebers wurden 100 µl des Filtrats in die HPLC-Anlage injiziert.

Für die Mehrpunkteichung wurde ein Gemisch aus neun organischen Säuren einer jeweiligen Konzentration von 100 µM eingesetzt (Citrat, Malonat, Succinat, Formiat, Acetat, Propionat, Butyrat, Valeriat und Capronat).

Messbedingungen der HPLC (Sykam, Gilching, Deutschland):

Pumpe:	S 1100
Temperierbarer Säulenofen:	S 4110
Trennsäule:	CARBOSep H Plus
	Länge: 300 mm
	Durchmesser: 7,8 mm
	Trennmaterial: CARBOSep CAR-H Plus
Detektor:	UVIS-205, RI 2000
Automatischer Probenaufgeber:	S 5200
Ofentemperatur	70 °C
Eluent	5 mM H ₂ SO ₄
Fluss	0,3 ml min ⁻¹

2.4.6 Analysen der Bodenproben aus Linz, Österreich

Die chemischen Analysen der Kompost gedüngten Bodenproben aus Linz fanden durch den Betreiber der Versuchsanlage statt. Die Ergebnisse wurden freundlicherweise vom Institut für Mikrobiologie der Universität Innsbruck zur Verfügung gestellt.

Die Analysen fanden entsprechend der Österreichischen Normen, die den Boden als Pflanzenstandort betreffen, statt (ÖNORM EN; Winkler, 2004).

Tabelle 4

Chemische Eigenschaften der mit Kompost gedüngten Bodenproben des Langzeit Rotationsexperimentes in Linz, Österreich. Die Daten wurden von der Versuchstation in Linz erhoben und vom Institut für Mikrobiologie der Universität Innsbruck zur Verfügung gestellt.

Humus %: Entspricht organischem Kohlenstoff; B_{acetat}: „pflanzenverfügbares“ Bor.

Probe	pH _{CaCl2}	P ₂ O ₅ mg/100g	K ₂ O mg/100g	Mg _{CaCl2} mg/100g	Humus %	N _{GESAMT} %	B _{acetat} mg/kg
K a	6,6	19	16	13	2,4	0,12	1
K b	6,7	24	20	11	2,6	0,12	0,8
OWC a	6,9	28	22	12	3,6	0,16	1,1
OWC b	6,9	33	29	12	3	0,17	1,1
GIC a	6,9	33	26	13	2,8	0,16	1
GIC b	6,9	31	29	14	2,8	0,16	1,2
MIC a	6,9	40	57	20	3,1	0,15	1,2
MIC b	7,0	42	47	16	1,9	0,15	1
SSC a	7,3	83	18	7	3	0,15	1,2
SSC b	7,3	74	17	7	2,9	0,15	1,2
Austauschbare Kationen nach ÖNORM L 1086-2							
Probe	Ca	Mg	K	Na	Fe _{EDTA}	Mn _{EDTA}	Cu _{EDTA}
	mmolc/kg				mg/kg		
K a	136	15,1	4,1	0,2	787	536	8
K b	128	11,0	4,6	0,1	723	487	9
OWC a	138	12,9	5,7	0,2	759	483	9
OWC b	142	13,6	7,1	0,2	824	514	9
GIC a	136	13,7	6,3	0,2	746	483	9
GIC b	135	14,7	7,3	0,2	791	498	9
MIC a	123	21,2	13,1	0,2	812	494	9
MIC b	130	17,3	11,0	0,2	929	511	10
SSC a	161	7,7	4,2	0,1	1010	465	11
SSC b	166	7,5	4,4	0,1	983	471	12

Säurelösliche Elemente nach ÖNORM L 1085							
Probe	Zn _{EDTA}	P	Cu	Zn	Ni	Cr	Pb
	mg/kg	mg/kg					
K a	9	999	20	76	27	38	20
K b	10	1050	20	78	27	40	21
OWC a	13	1060	20	80	26	37	20
OWC b	13	1150	22	82	27	38	21
GIC a	13	1110	21	78	26	35	21
GIC b	12	1110	21	78	27	37	21
MIC a	16	1170	21	80	26	37	19
MIC b	13	1210	24	80	27	38	19
SSC a	19	1480	24	88	26	36	25
SSC b	18	1450	25	90	27	37	21
Probe	Cd	Hg					
	mg/kg						
K a	0,33	0,05					
K b	0,34	0,07					
OWC a	0,32	0,06					
OWC b	0,34	0,07					
GIC a	0,32	0,07					
GIC b	0,33	0,06					
MIC a	0,31	0,06					
MIC b	0,34	0,07					
SSC a	0,34	0,09					
SSC b	0,33	0,13					

2.4.7 Gaschromatographische Messung der potentiellen Methanbildung

Um die potentielle methanogene Aktivität in Kompost und/oder Bodenmaterial zu untersuchen, wurden jeweils 5 g aufbereitete Probe in sterile 120 ml Serumfläschchen eingewogen (je nach Fragestellung wurden pro Experiment mehrere parallele Proben angesetzt, Abbildung 3) und mit anoxischem Reinstwasser versetzt (Kompost 10 ml, Boden 5 ml). Anschließend wurden die Flaschen mit ausgekochten Butylstopfen verschlossen. Die Flaschenatmosphäre wurde mit Stickstoff (Reinheitsgrad 4.6) gespült. Die Inkubationen fanden - dem Versuch entsprechend - bei unterschiedlichen Temperaturen im Dunkeln statt. Die Gasproben wurden mit einer gasdichten Spritze (Pressure-lock[®] A-2 series, Dynatech, Baton Rouge, Louisiana) aus den Inkubationsfläschchen entnommen, und die entsprechenden Methankonzentrationen wurden mit einem Gaschromatographen mit integriertem Flammenionisationsdetektor (Perkin & Elmer, Norwalk, USA) gemessen. Die Darstellung und Integration der Peakflächen wurde mit dem Programm Peak Simple (SRI Instruments, California, USA) durchgeführt. Ein Standardgas (99,9 ppmv Methan) diente als Referenzwert.

Messbedingungen

Hauptsäule:	Edelstahl, 80-100 mesh
	Länge: 3 m
	Durchmesser: 1/8 Zoll
	Trennmaterial: Higher sep Q
Vorsäule:	Edelstahl, Molekularsieb, 60-80 mesh
	Länge: 2 m
	Durchmesser: 1/8 Zoll
Temperaturen:	Injektor 110 °C
	Säule 50 °C
	Detektor 230 °C
Trägergas:	Stickstoff (Reinheitsgrad 5.0)
Brenngase:	Wasserstoff (Reinheitsgrad 5.0), synthetische Luft

2.4.7.1 Berechnungen der Methankonzentrationen

Für die Umrechnung des Mischungsverhältnisses des Methans (ppmv) in die Stoffmenge [mol], wurde folgende Ableitung der allgemeinen Gasgleichung angewendet.

$$(1) \quad n = \frac{pV}{RT}$$

n : Stoffmenge [mol]

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

V : Volumen des Gasraumes im Reaktionsgefäß [l]

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

T : Temperatur in Kelvin (273,15 K = 0 °C)

Die Stoffmengen wurden auf das Trockengewicht der Proben umgerechnet und die Methanproduktionsraten durch lineare Regressionsanalyse der ansteigenden Methankonzentrationen bestimmt. Die Steigungen der Geraden wurden mit dem Microsoft[®] Excel 2003 Software Paket berechnet.

2.4.8 Statistische Auswertung

Das Statistik „Add-In“ WinSTAT für Microsoft® EXCEL wurde für Clusteranalysen unterschiedlicher Bodenparameter herangezogen.

2.5 Inkubationsexperimente zur potentiellen Methanbildung

2.5.1 Einfluss der Temperatur auf die potentielle Methanbildung

Zur Bestimmung der optimalen Temperatur für die Methanbildung in unterschiedlichen Materialien wurden die befüllten Serumfläschchen (Abschnitt 2.4.7, Abbildung 3) bei verschiedenen Temperaturen zwischen 25 °C-80 °C in Trockenschränken (Memmert, Schwabach) inkubiert. Die Methanbildungsraten wurden entsprechend Abschnitt 2.4.7 bestimmt.

2.5.2 Einfluss von UV-Bestrahlung auf die potentielle Methanbildung

300 g reifes CC Kompostmaterial wurden über ein 2 mm Edelstahlsieb abgesiebt und auf einem Labortisch gleichmäßig verteilt (Schichtdicke des Komposts ca. 3 mm). Eine UV-Lampe (VL-315 G, LTF-Labortechnik, Wasserburg; 254 nm, 3×15 W) wurde 1 m über dem Tisch platziert (Abbildung 6A). Der Kompost wurde nun für 4 h - entsprechend einer Dosis von 13,7 KJ m⁻² - bzw. für 24 h - entsprechend einer Dosis von 82,1 KJ m⁻² - bestrahlt. Während der ersten 13 Stunden wurde das Material stündlich gemischt. Als Kontrolle wurde parallel dazu ein Aliquot des Ausgangsmaterials auf einem zweiten Tisch in entsprechender Weise verteilt und in derselben Zeitspanne unbestrahlt belassen. Die Proben wurden vor der gaschromatographischen Messung (Abschnitt 2.4.7) mit 10 ml anoxischem Wasser wieder befeuchtet und bei 50 °C für 26,5 h inkubiert.

2.5.3 Einfluss von Substratzugabe auf die potentielle Methanbildung

Von dem luftgetrockneten reifen CC Kompostmaterial, welches im Experiment zum Einfluss der UV-Strahlung auf die potentielle Methanbildung als Kontrolle diente (Abschnitt 2.5.2), wurden sechs parallele Ansätze folgendermaßen aufbereitet: Drei Ansätze wurden anstatt mit anoxischem Wasser mit 10 ml 15 mM Natriumacetatlösung versetzt. Die Flaschenatmosphären der anderen drei Ansätze wurden mit 10 ml anoxischem Wasser versetzt und vor der Inkubation anstatt mit Stickstoff mit Wasserstoff

(Reinheitsgrad 5.0) gespült (Fey und Conrad, 2003). Die Inkubation und Messung der Proben erfolgte entsprechend Abschnitt 2.4.7 bei 50 °C.

2.5.4 Einfluss der Austrocknung des Kompostmaterials auf die potentielle Methanbildung

400 g reifes CC Kompostmaterial wurden über ein Sieb mit 2 mm Maschenweite abgeseibt und in eine Gas-Waschflasche eingewogen. Ein Ausgang der Flasche wurde über einen Schlauch mit einer Vakuumpumpe verbunden (Abbildung 6B), die permanent Laborluft durch das Kompostmaterial saugte. Nach 1,5 h (entsprechend 2,7 m³ angesaugter Luft), 3,5 h (entsprechend 5,3 m³ angesaugter Luft) bzw. 5,25 h (entsprechend 6,9 m³ angesaugter Luft) wurde von diesem Material eine Probe entnommen, befeuchtet und bei 50 °C anoxisch inkubiert.

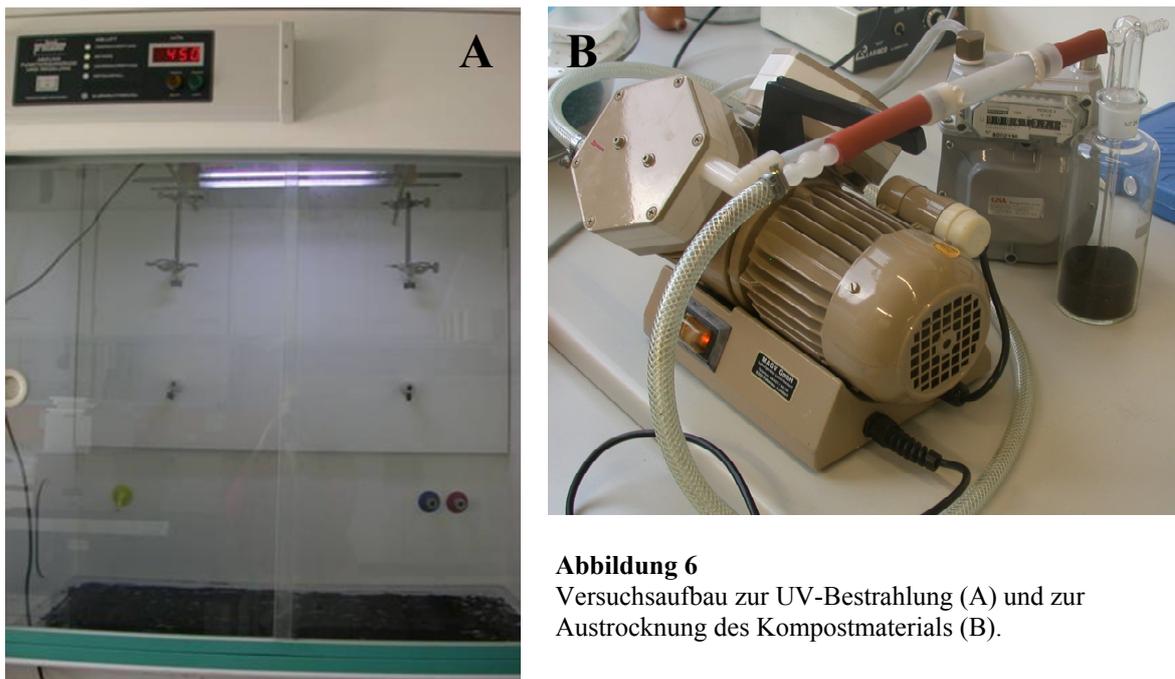


Abbildung 6
Versuchsaufbau zur UV-Bestrahlung (A) und zur Austrocknung des Kompostmaterials (B).

2.5.5 Einfluss des pH-Wertes im Kompostmaterial auf die potentielle Methanbildung

Um den Einfluss des pH-Wertes im Kompostmaterial auf die Methanbildung zu untersuchen, wurde 6 Wochen altes CC Kompostmaterial mit einem niedrigen AusgangspH-Wert (4-5) in Fläschchen eingewogen und mit 10 ml anoxischem Wasser und 2 ml 10 %iger Kalkmilch versetzt. Parallel wurde das gleiche Ausgangsmaterial mit 12 ml

anoxischem Wasser versetzt. Je Versuchsbedingung wurden sieben parallele Ansätze bei 55 °C für 5 Tage inkubiert. Anschließend wurde die Methankonzentration in der Flaschenatmosphäre gaschromatographisch bestimmt (Abschnitt 2.4.7).

2.5.6 Einfluss der Sauerstoffkonzentration auf die potentielle Methanbildung

Der Einfluss von Sauerstoff auf die laufende Methanbildung wurde untersucht, indem über gaschromatographische Messungen die ansteigenden Methankonzentrationen in anoxischen Inkubationen von reifen CC Kompost bei 50 °C verfolgt wurden. Sobald sich der Anstieg der Methankonzentration in der Flaschenatmosphäre in einem linearen Bereich befand (nach ca. 29h), wurden unterschiedliche Volumina an reinem Sauerstoff in die Fläschchen injiziert, so dass die Endkonzentrationen in der Flaschenatmosphäre 2,0, 6,0, 8,8, 20,5, 23,0 und 38,0 % betragen. Der anschließende Verlauf der Methanbildung wurde für weitere 10 h verfolgt.

2.5.7 Inkubationsexperiment mit luftgetragenen thermophilen Methanogenen

Um thermophile methanogene *Archaea* in den Bioaerosolen auf Kompostierungsanlagen nachzuweisen, wurden die mit Bioaerosolen beaufschlagte Gelatinefilter (Abschnitt 2.3) in *Methanosarcina thermophila*-selektives Nährmedium überführt und bei 50 °C inkubiert. Die methanogene Aktivität wurde ermittelt, indem die Konzentration des Methans in der Flaschenatmosphäre gaschromatographisch im Verlauf der Inkubation bestimmt wurde (Abschnitt 2.4.7).

2.5.7.1 Herstellung des Mediums zur Inkubation nach Widdel und Bak, 1992

Für die anoxische Inkubation der mit Bioaerosolen beaufschlagten Gelatinefilter wurde das DSMZ Medium 164 (www.dsmz.de) in modifizierter Form anoxisch hergestellt (Widdel und Bak, 1992). Dieses Medium wird zur spezifischen Kultivierung von *Methanosarcina thermophila* angewendet.

Zusammensetzung des Grundmediums für 1 l Medium:

K ₂ HPO ₄	0,348 g
KH ₂ PO ₄	0,227 g
NH ₄ Cl	0,5 g

MgSO ₄ × 7 H ₂ O	0,5 g
CaCl ₂ × 2 H ₂ O	0,25 g
NaCl	2,25 g
FeSO ₄	0,002 g

Die eingewogenen Chemikalien wurden in 870 ml Reinstwasser gelöst und in einem Widdelkolben 40 min bei 121 °C autoklaviert. Der pH-Wert lag bei 6,8.

Spurenelementlösung SL10:

HCl 2 M	50ml
FeCl ₂ × 4 H ₂ O	1 g
ZnCl ₂	70 mg
MnCl ₂	100 mg
H ₃ BO ₃	6 mg
CoCl ₂ × 6 H ₂ O	190 mg
CuCl ₂ × 2 H ₂ O	2 mg
NiCl ₂ × 6 H ₂ O	24 mg
Na ₂ MoO ₄ × 2 H ₂ O	36 mg

Zunächst wurde das FeCl₂ in HCl gelöst und dann mit etwas Reinstwasser gemischt. Anschließend wurden die restlichen Salze gelöst und auf 1 l mit Reinstwasser aufgefüllt. Die Lösung wurde autoklaviert. 1 ml dieser Spurenelementlösung wurde 1 l Grundmedium zugegeben.

Vitamine:

„5er-Mix“

Pyridoxindihydrochlorid	15 mg
Nicotinsäure	10 mg
Calcium-D(+)-Panthothenat	5 mg
4-Aminobenzoesäure	4 mg
D(+)-Biotin	1 mg

Das Biotin wurde im ca. 50 °C warmen Natriumphosphatpuffer gelöst. Nach dem Abkühlen wurden die anderen Vitamine beigemischt und auf 100 ml mit

Natriumphosphatpuffer (10 mM, pH 7,1) aufgefüllt. Die Lösung wurde sterilfiltriert (Porendurchmesser 0,2 µm; Schleicher und Schüll, Dassel). 1 ml dieser Vitaminlösung wurde 1 l Grundmedium zugegeben.

Cobalamin

5 g Cyanocobalamin wurden in 100 ml Reinstwasser gelöst und anschliessend autoklaviert.

Riboflavin

5 g Riboflavin wurden in 100 ml Reinstwasser gelöst und anschliessend autoklaviert.

Thiamin

10 g Thiaminhydrochlorid wurden in 100 ml Natriumphosphatpuffer (25 mM, pH 3,4) gelöst und anschliessend sterilfiltriert.

Von der Cobalamin-, Riboflavin- bzw. Thiaminlösung wurde je 1 ml dem 1 l Grundmedium zugesetzt.

Folsäure

1 g Folsäure wurden in 500 ml Reinstwasser gelöst und anschliessend sterilfiltriert.

Liponsäure

2,5 g Liponsäure wurden in 500 ml Reinstwasser gelöst und anschliessend sterilfiltriert.

Von der Folsäure- bzw. Liponsäurelösung wurden je 10 ml dem 1 l Grundmedium zugesetzt.

Weitere Zusätze zum Grundmedium:

Hefeextrakt (5 % in Reinstwasser)	40 ml
Trypton (5 % in Reinstwasser)	40 ml
Methanol (99,9 %)	10 ml
NaHCO ₃ (1M)	10 ml
Na ₂ S (0,2 M)	5 ml
Sludge fluid	40 ml

Das „Sludge fluid“ wurde folgendermaßen, nach Anweisungen der DSMZ (www.dsmz.de), angesetzt. Klärsschlamm einer kommunalen Kläranlage wurden 0,4 % Hefeextrakt zugesetzt. Das Gemisch wurde anschließend mit Stickstoff begast und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Dann wurde der Ansatz bei 13000 g zentrifugiert, der Überstand sterilfiltriert und in Schraubdeckelröhrchen aliquotiert. Die Flaschenatmosphäre wurde mit Stickstoff gespült.

Alle Zusätze und Lösungen wurden dem Grundmedium unter N₂/CO₂ (80 % / 20 %) Begasung mit sterilen Glaspipetten zugefügt. Nach Zugabe aller Bestandteile wurde zur Kontrolle des pH-Wertes ein Aliquot entnommen, um gegebenenfalls den pH-Wert des Mediums mit 1 M Na₂CO₃ oder 1 M HCl auf pH 6,8 einzustellen. Anschließend wurde das Medium in sterile 50 ml Glasfläschchen mit Schraubdeckelverschluß (Ochs, Bovenden) abgefüllt und bei Raumtemperatur im Dunkeln gelagert.

2.5.7.2 Inkubation der auf die Gelatinefilter beaufschlagten Methanogenen

Die beaufschlagten Gelatinefilter wurden in sterilen Petrischalen grob zerkleinert und in jeweils ein steriles 120 ml Serumfläschchen überführt. Pro Serumflasche wurden 60 ml *Methanosarcina thermophila* spezifisches Nährmedium (Abschnitt 2.5.7.1) zugegeben. Die Flaschenatmosphäre wurde mit einem N₂/CO₂ Gasgemisch (80 % / 20 %, www.dsmz.de) ausgetauscht. Die auf diese Weise mit Mikroorganismen inokulierten Nährmedien wurden nun bei 50 °C inkubiert.

2.6 Bestimmung der *In situ* Methankonzentrationen im Profil von Kompostmieten

Für die Bestimmung der Methankonzentration in der Gasatmosphäre im Inneren von Kompostmieten wurde eine speziell konstruierte Gassonde verwendet (angefertigt von der Werkstatt des Physikalischen Institutes der Universität Giessen; Abbildung 7). In einem ca. 2,30 m langen Edelstahlrohr wurden fünf Kupferkapillaren (Innendurchmesser 3 mm) so verschweißt, dass ihre Enden in Bohrlöcher in der Außenwand des Rohres mündeten. Die Bohrlöcher hatten jeweils einen Abstand von 30 cm zueinander. Am oberen Ende waren die Kapillaren über einen Schlauch und einen Dreiwegehahn mit 60 ml Plastikspritzen (Plastipak, Madrid, Spanien) verbunden. Für die Probennahme wurde das Stahlrohr in die Miete hinein getrieben, so dass es möglich war, aus fünf verschiedenen Tiefen der Kompostmiete je 50 ml Gasprobe zu entnehmen. Für die gaschromatographische Messung

der Proben wurden die 60 ml Spritzen über ein Schlauchstück mit der Injektionsspritze (Pressure-lock® A-2 series, Dynatch, Baton Rouge, Louisiana, USA) verbunden, eine Gasprobe entnommen und diese injiziert und so auf die Trennsäule aufgebracht.

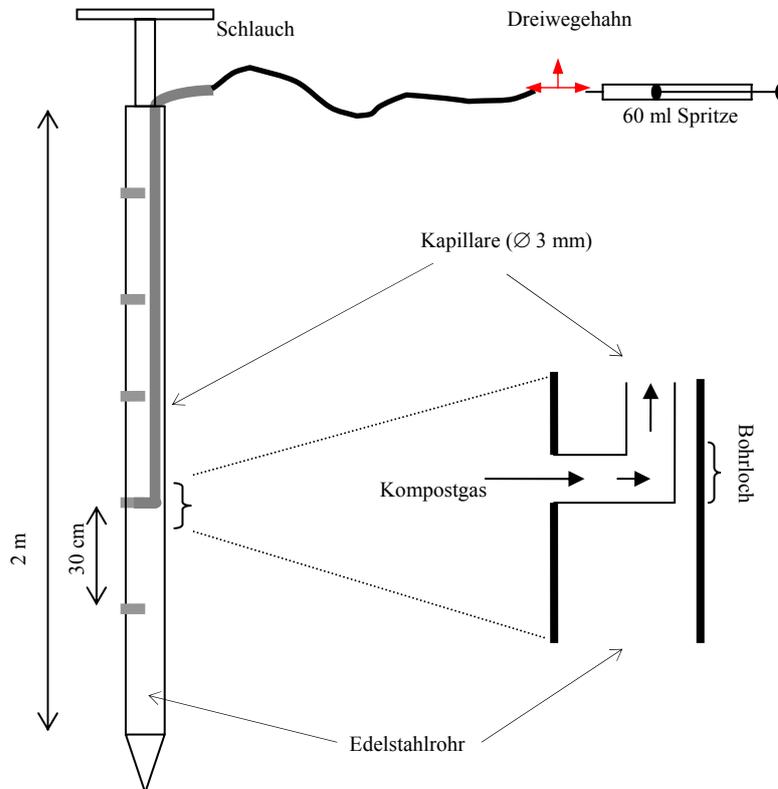


Abbildung 7

Skizze zum Versuchsaufbau für die Probennahme von 50 ml Gasprobe in unterschiedlichen Tiefen einer Kompostmiete.

2.6.1 Bestimmung des pH-Wertes und des Wassergehaltes im Profil einer Kompostmiete

Mit einem Spaten wurde ein Loch in die Mitte einer 6 Wochen alten CC Kompostmiete gegraben, so dass aus unterschiedlichen Tiefen (15, 30, 45, 60, 75, 90, 105, 120 und 135 cm) Kompostmaterial entnommen werden konnte. Holzplanken, die zum Abstützen der Lochinnenwände benutzt wurden, verhinderten die Vermischung von Kompostmaterial unterschiedlicher Tiefen. Die Proben wurden in das Labor transportiert und der pH-Wert und Wassergehalt wurden entsprechend den Abschnitten 2.4.1 und 2.4.2 bestimmt.

2.7 Molekularbiologische Untersuchungen

Um die Population der methanogenen *Archaea* im Kompostmaterial und anderen organischen Materialien näher zu charakterisieren, wurden unterschiedliche molekularbiologische Techniken angewendet. Das Zielgen für alle molekularbiologischen Untersuchungen war das 16S rRNA-Gen.

2.7.1 Extraktion der genomischen DNA

Mit der Extraktionsmethode soll mit einer möglichst hohen Ausbeute reine DNA für die Weiterverarbeitung gewonnen werden. Insbesondere bei der Extraktion von DNA aus Komposten kann das Problem auftreten, dass hohe Gehalte an Huminsäuren die spätere PCR-Reaktion hemmen (Tebbe und Vahjen, 1993). Um diesen Effekt zu minimieren, wurde für die DNA-Extraktion ein kommerziell erhältliches Kit verwendet und der anschließenden PCR-Reaktion stets bovines Serumalbumin zugesetzt (BSA, Tabelle 6; Kreader, 1995).

Parallel zur Extraktion der Proben wurden immer Blindextraktionen durchgeführt, die analog zu den Umweltproben, jedoch ohne Probematerial, durchgeführt wurden. So sollte über eine spätere PCR festgestellt werden, ob kontaminationsfrei gearbeitet wurde.

2.7.1.1 DNA Extraktion aus Kompost, Boden und Mist

Im Vergleich mit anderen Extraktionsmethoden konnten die besten Ergebnisse in Bezug auf Ausbeute und Reinheit der DNA mit dem FastDNA Spin Kit for Soil (Bio 101, Qbiogene, Heidelberg) erzielt werden. Auf Grund dessen wurden alle DNA Extraktionen mit diesem kommerziell erhältlichen Kit in leicht modifizierter Form nach Anweisung des Herstellers durchgeführt. 0,5 g der jeweiligen Boden- oder Kompostprobe wurden durch Zirkoniumkügelchen in den Lysing Matrix E Röhrchen mit Hilfe einer Zelmühle (Retsch, Hahn) für 30 s bei maximaler Geschwindigkeit (ca. 1 m s^{-1}) aufgeschlossen. Zur Reduktion des Huminsäuregehaltes fand ein zusätzlicher Waschschriff der an die Säule gebundenen DNA mit 500 μl 5,5 M Guanidin-Thiocyanat-Lösung statt (Kolb, 2003).

Die DNA Extrakte wurden mittels Gelelektrophorese quantitativ und qualitativ überprüft. Dafür wurde die DNA über ein 1 %iges Agarosegel bei einer Spannung von 130 V für 45 min in TBE-Puffer (Tris-Borat-EDTA) aufgetrennt. Die DNA-Banden im Gel wurden anschließend für 30 min in einem Ethidiumbromid-Bad ($0,5 \mu\text{g ml}^{-1}$) gefärbt und unter

einem Transluminator (Gel Doc 2000, Quantity one 4.2.1, Bio-rad, Segrate, Italien) mittels UV-Licht sichtbar gemacht und digital dokumentiert.

Die DNA-Extrakte wurden in 5 µl Aliquots bei -20 °C bis zur weiteren Verarbeitung gelagert.

2.7.1.2 DNA Extraktion aus den auf Gelatinefiltern beaufschlagten Mikroorganismen

Der mit Bioaerosolen beaufschlagte Gelatinefilter wurde mit einem sterilen Skalpell grob zerkleinert und in einem Falcon-Röhrchen in 10 ml physiologischer Kochsalzlösung (0,9 % w/v, mit 0,2 % Tween80[®], Sigma-Aldrich, Darmstadt) für 15 min bei 30 °C im Wasserbad (Köttermann, Uetze/Hänigsen) durch Schütteln gelöst. Die Suspensionen wurden in demselben 2 ml Reaktionsgefäß nacheinander für 10 min bei 17380 g und RT abzentrifugiert (EBA 12, Hettich, Rabenau-Londorf). Das Pellet wurde anschließend mit dem im FastDNA Spin Kit for Soil enthaltenen SPB Puffer aufgenommen und die DNA entsprechend Abschnitt 2.7.1.1 extrahiert.

2.7.1.3 DNA Extraktion aus Flüssigkulturen der auf Gelatinefiltern gesammelten Mikroorganismen

Die DNA aus der Flüssigkultur der inkubierten Gelatinefilter (Abschnitt 2.5.7.2) wurde folgendermaßen gewonnen. Nach unterschiedlichen Zeitspannen der Inkubation wurde aus den Serumfläschchen mit einer sterilen 5 ml Spritze 2 ml Kultur entnommen, die Zellen abzentrifugiert und das Zellpellet mit dem im Kit enthaltenen SPB und MT Puffer aufgenommen und in das Lysing Matrix E Röhrchen überführt. Die folgenden Schritte wurden wie in Abschnitt 2.7.1.1 beschrieben durchgeführt.

2.7.2 PCR

Die PCR diente als Grundlage aller folgenden molekularbiologischen Untersuchungen. Dabei wurden entsprechend des Verwendungszweckes unterschiedliche Primersysteme (Tabelle 5, alle MWG Biotech, Ebersberg), Reaktionsgemische und Temperaturprofile (Tabelle 6) verwendet. Alle PCR-Reaktionen wurden mit Hilfe des Thermocyclers MyCycler[™] (Biorad, München) durchgeführt. Um die PCR Produkte auf Spezifität und Größe des amplifizierten Sequenzabschnittes zu überprüfen, wurde anschließend eine gelelektrophoretische Auftrennung über ein 1,7 %iges Agarosegel durchgeführt (Abschnitt 2.7.1.1).

Tabelle 5

In dieser Arbeit eingesetzte Primer.

Primer	Zielorganismus	Position im 16S rRNA-Gen ^a	Sequenz (5'-3')	Tm	Referenz
A112f	<i>Archaea</i>	112-127	GCT CAG TAA CAC GTG G	51,7 °C	Stahl & Amann, 1991
A934b	<i>Archaea</i>	934-954	GTG CTC CCC CGC CAA TTC CT	63,5 °C	Großkopf <i>et al.</i> , 1998a
x036r	<i>Archaea</i>	333	CCC CGT AGG CCT GGA	59,4 °C	Diese Arbeit
Mtb836f	<i>Methanothermobacter</i> sp.	836	GAT GGC TTC GAG CTG CCC CA	63,5 °C	Diese Arbeit
Mb1174r	<i>Methanobacteriaceae</i>	1174-1195	TAC CGT CGT CCA CTC CTT CCT C	64,0 °C	Raskin <i>et al.</i> , 1994
Ms628f	<i>Methanosarcina thermophila</i>	628	GGC TTT CGG TGG ATA CTG CC	61,4 °C	Diese Arbeit
Ms821	<i>Methanosarcina</i>	821-844	CGC CAT GCC TGA CAC CTA GCG AGC	69,6 °C	Raskin <i>et al.</i> , 1994
Mcth983f	<i>Methanoculleus thermophilus</i>	983	CCG GAT AGG ACA GCA GAA TG	59,4 °C	Diese Arbeit
Mg1200	<i>Methanomicrobiaceae</i>	1200-1220	CGG ATA ATT CGG GGC ATG CTG	61,8 °C	Raskin <i>et al.</i> , 1994
Com1	<i>Bacteria</i>	519-536	CAG CAG CCG CGG TAA TAC	58,2 °C	Schwieger und Tebbe, 1998
Com2	<i>Bacteria</i>	907-926	CCG TCA ATT CCT TTG AGT TT	53,2 °C	Schwieger und Tebbe, 1998
M13f	pUC Plasmid	2941-2957	GTA AAA GGA CGG CCA G	51,7 °C	Promega, Madison, USA
M13r	pUC Plasmid	161-177	CAG GAA ACA GCT ATG AC	50,4 °C	Promega, Madison, USA
A109f	<i>Archaea</i>	190	ACG GCT CAG TAA CAC GT	47,0 °C	Lueders & Friedrich, 2000
A915r	<i>Archaea</i>	915	CTC CCC CGC CAA TTC CTT TA	54,0 °C	Lueders & Friedrich, 2000

^aNummerierung entsprechend des *Escherichia coli* 16S rRNA-Gens (Brosius *et al.*, 1981)

2.7.2.1 Quantifizierung von *Archaea* und *Bacteria* in CC Kompostmaterial

A. Quantifizierung mittels MPN-PCR

Die MPN-PCR (Most Probable Number-PCR) liefert auf statistischem Weg, je nach angewendetem Primer, Werte für die grobe Abschätzung der Anzahl bestimmter Gene oder Genfragmente in einer Probe. Um die Anzahl an *Archaea* im Vergleich zur Anzahl an *Bacteria* zu bestimmen, wurde eine MPN-PCR mit drei parallelen Ansätzen durchgeführt. Fünf aufeinanderfolgende Dezimalverdünnungsstufen des entsprechenden DNA-Extraktes wurden mit PCR-Wasser angefertigt. Je 1 µl aller Verdünnungsstufen wurde in eine PCR mit den *Bacteria* spezifischen Primer Com1/Com2 bzw. mit den *Archaea* spezifischen Primern A112f/A934b eingesetzt (Tabelle 5). Die höchste Verdünnung, bei der noch ein PCR-Produkt im Gel sichtbar war, wurde notiert. Mit Hilfe einer Standard MPN-Tabelle (De Man, 1983) konnte die Anzahl an 16S rRNA-Genen abgeschätzt werden. Um die daraus resultierenden Zellzahlen zu ermitteln, wurde eine durchschnittliche 16S rRNA-

Operonanzahl von 3,6 für *Bacteria* (Ochsenreiter *et al.*, 2003) und 2,5 für *Archaea* angenommen (rrndb.cme.edu/rrndb/servlet/controller).

B. Quantifizierung mittels der Methanbildungsrate

Zusätzlich wurde eine annähernde Berechnung der Anzahl der Methanogenen in den Proben über die Methanbildungsrate durchgeführt. Die Methanbildungsrate eines 6 Wochen alten CC Komposts betrug $0,59 \mu\text{mol Methan g-FG}^{-1} \text{h}^{-1}$. Unter der Annahme, dass z. B. *Methanothermobacter thermoautotrophicus* ein V_{max} von ca. 2 (1-3,2) $\mu\text{mol Methan pro Minute und mg Zellen}$ hat (Perski *et al.*, 1982), und eine Zelle eine Masse von ca. 500 fg besitzt (übertragen von *E. coli* mit 20-1000 fg pro Zelle; Loferer-Kröbächer *et al.*, 1997), wurde eine Abschätzung der Zellzahl der methanogenen *Archaea* durchgeführt.

2.7.2.2 Realtime-PCR

Die quantitative Realtime-PCR wurde in dieser Arbeit angewendet, um Konzentrationsänderungen der methanogenen Spezies *Methanosarcina thermophila* zu bestimmen. Hierzu wurden zwei Proben der Flüssigkulturen aus mit Bioaerosolen beaufschlagten Gelatinefiltern untersucht (Abschnitt 2.5.7.2).

Pro zu untersuchender Probe wurden vier parallele PCR-Ansätze angefertigt. Je Ansatz wurden 5 μl des ABsolute™ QPCR SYBR® Green Mix (ABgene®, Hamburg), 0,2 μl je Primer (Ms628/Ms821, Tabelle 5), 2 μl DNA und 2,6 μl PCR-Wasser zusammen pipettiert. Zusätzlich wurden eine Positivkontrolle (*Methanosarcina thermophila* (DSM 1825^T); 2 μl der Reinkultur wurden direkt in die PCR eingesetzt), eine Negativkontrolle (*Methanosarcina barkeri* (DSM 10131); 2 μl der Reinkultur wurden direkt in die PCR eingesetzt) und ein Blindwert angesetzt. Die PCR fand mit Hilfe des Rotorgene 3000 Cycler (Corbett Research, Australien) unter Anwendung des in Tabelle 7 dargestellten Temperaturprogrammes statt. Die Fluoreszenzmessung fand bei einer Extinktion von 470 nm und einer Emission von 585 nm statt.

Tabelle 7

Temperaturprogramm für die Durchführung der Q-PCR mit *Methanosarcina thermophila* spezifischem Primersystem Ms628/Ms821 (Tabelle 5).

Schritt	Prozess	Temperatur	Dauer
1	Denaturierung	95 °C	15 Minuten
2	Denaturierung	94 °C	15 Sekunden
3	Annealing	70 °C	15 Sekunden
4	Elongation/1. Fluoreszenzmessung	72 °C	15 Sekunden
5	2. Fluoreszenzmessung	80 °C	15 Sekunden
		Zyklenanzahl	26
	Schmelzkurve	55-99 °C in 0,5 °C Schritten	

2.7.2.3 Entwicklung spezifischer Primersysteme für die Detektion thermophiler methanogener Archaea und Optimierung der PCR Reaktion

Um das Vorkommen der thermophilen methanogenen Spezies *Methanosarcina thermophila*, *Methanoculleus thermophilus* und *Methanothermobacter thermoautotrophicus* in Umweltproben wie Kompost und Böden mit Hilfe der PCR-Methode nachweisen zu können, wurden drei für diese Spezies spezifische Primersysteme entwickelt (Tabelle 8).

Für die spezifischen Primersysteme wurden die ursprünglich für die Fluoreszenz- *in situ*-Hybridisierung entwickelten Sonden von Raskin *et al.* (1994) als Rückwärtsprimer eingesetzt (Tabelle 8). Die Sonde MS821 detektiert spezifisch die Gattung *Methanosarcina*. Die Sonde MG1200 ist spezifisch für die Familien *Methanomicrobiaceae*, *Methanocorpusculaceae* und *Methanoplanaceae*, wobei die Sonde MB1174 für den Nachweis der Familie *Methanobacteriaceae* entwickelt wurde. Für das Design der jeweiligen Vorwärtsprimer wurde das ARB Software Paket (Ludwig *et al.*, 1998) mit einer *Archaea* Datenbank (Version Juergens April 2003) unter der Verwendung des „Probe Design“ Tools eingesetzt. Potentielle Primersequenzen wurden *in silico* mit dem „Probe Match“ Tool auf ihre Spezifität geprüft. Der Vorwärtsprimer wurde so ausgewählt, dass er zusammen mit dem entsprechenden Rückwärtsprimer ein System ergab, welches in der späteren PCR spezifisch die Amplifikation des 16S rRNA-Genfragmentes einer Spezies induzieren sollte. Abschließend fand mit dem Programm MEGA 3 (Kumar *et al.*, 2004) das Alignment von verschiedenen Sequenzen der jeweiligen Spezies (BLASTn 2.2.14, www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) mit den ausgewählten Primern statt. Im Alignment-Explorer des MEGA 3 Programmes war es möglich, die Sequenzen auf die Länge des nach der Amplifikation zu erwartenden 16S rRNA-Genfragmentes zu

schneiden. Mit dieser Teilsequenz wurde eine BLAST Suche durchgeführt, um zu prüfen, ob über dieses Fragment eine Unterscheidung der Spezies von anderen möglich war. Anschließend wurden die Primer bei MWG Biotech (Ebersberg) bestellt.

Für die PCR Optimierung wurden anhand des ARB „Probe Match“ Tool Stämme als Negativkontrollen ausgewählt (Tabelle 8). Dabei wurden Sequenzen berücksichtigt, die bis zu zwei Basenfehlpaarungen gegenüber der jeweiligen Primersequenz zeigten. Pro Art und Position der Fehlpaarung wurde ein Stamm stellvertretend als Negativkontrolle von der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) bezogen. Weiterhin wurde pro zu etablierendem Primersystem eine Positivkontrolle bestellt (Tabelle 8).

Die von der DSMZ gelieferten Flüssigkulturen wurden direkt, ohne vorherige DNA-Extraktion, in die PCR Reaktion eingesetzt. Zunächst wurden die PCR Bedingungen so gewählt, dass ausschließlich die Positivkontrollen amplifiziert wurden (Tabelle 6). Anschließend wurden verschiedene Kompost-DNA-Extrakte (CC Material: 4 Wochen alt, 6 Wochen alt, reif; NC Material: 4 Wochen alt, 19 Wochen alt, reif) in einen PCR-Ansatz mit den spezifischen Primersystemen eingesetzt.

Um auszuschließen, dass bei den Umweltproben, aus denen kein positives PCR-Produkt erhalten wurde, eine Hemmung der PCR stattgefunden hatte, wurden zu den jeweiligen DNA-Extrakten zusätzlich Zellen der entsprechenden Positivkontrollen gegeben (9 µl PCR-Wasser + 2 µl Kompost DNA-Extrakt + 2 µl Flüssigkultur der Reinkultur) und die PCR wiederholt. Um die Spezifität der verwendeten Primer zu überprüfen wurde von den DNA Extrakten die ohne Zusatz von Zellen ein PCR-Produkt zeigten ein Gemisch hergestellt (jeweils 1 µl), welches anschließend erneut in eine PCR mit den spezifischen Primern eingesetzt wurde. So wurde für die PCR mit dem *Methanosarcina thermophila* spezifischen Primersystems ein Gemisch aus DNA Extrakten von reifem NC Kompost, reifem CC Kompost und 4 Wochen altem CC Kompost eingesetzt. Für das Primersystem für *Methanoculleus thermophilus* kam ein Gemisch aus den DNA Extrakten der Komposte reif CC, reif NC und 19 Wochen altem NC zum Einsatz. Für das *Methanothermobacter thermoautotrophicus* spezifische Primersystem wurde ein Gemisch aus 4 Wochen altem und 19 Wochen altem NC sowie 4 Wochen altem CC Kompost als „Template“ in die PCR eingesetzt. Das aus dieser Amplifikation resultierende PCR-Produkt wurde zur Spezifitätsüberprüfung der Primer kloniert (Abschnitt 2.7.4).

Tabelle 8

Für die PCR Optimierung ausgewählte Stämme als Positiv- und Negativkontrollen. Dargestellt sind Art und Position der Basenfehlpaarung auf der jeweiligen Primersequenz. W (mis) bezeichnet den gewichteten Unterschied der Fehlpaarungs-Positionen (übernommen aus ARB).

Positivkontrolle	DSM Nr., Acc. Nr. des 16S rRNA- Gens	Negativkontrolle	DSM Nr., Acc. Nr.	Basenfehlpaarung der Primersequenz gegenüber 16S rRNA-Gensequenz	W(mis)
				Sequenz Ms628f: 5' ----- U ----- 3'	
<i>Methanosarcina thermophila</i>	DSM 1825 ^T , M59140	<i>Methanosarcina barkeri</i>	DSM 10131, AF028692	5' ----- G ----- 3'	0,6
				Sequenz Mc983f: 5' ----- G ----- A ----- 3'	
<i>Methanoculleus thermophilus</i>	DSM 3915, M59129	<i>Methanoculleus bourgense</i>	DSM 6216, AB065298	5' ----- A ----- 3'	1,5
		<i>Methanoplanus limicola</i>	DSM 2279, M59143	5' ----- A ----- G ----- 3'	1,7
		<i>Methanocorpusculum bavaricum</i>	DSM 4179, AF095266	5' ----- A ----- U ----- 3'	2,6
		<i>Methanomicrobium mobile</i>	DSM 1539, M59142	5' ----- G ----- 3'	0,2
				Sequenz Mtb836f: 5' G ----- U ----- C ----- 3'	
<i>Methanothermobacter thermoautotrophicum</i>	DSM 9446, Z37156	<i>Methanobacterium congolense</i>	DSM 7095 ^T , AF233586	5' ----- U ----- 3'	0,6
		<i>Methanobacterium formicicum</i>	DSM 10111, AF028689	5' ----- C ----- 3'	1,1
		<i>Methanobacterium bryantii</i>	DSM 10113, AF028688	5' A ----- U ----- 3'	2,1

2.7.3 Single Strand Conformation Polymorphism (PCR-SSCP)

Die Zusammensetzung der *Archaea*-Population in verschiedenen Kompostmaterialien, Mist und Böden wurde mittels der PCR basierenden SSCP-Methode verglichen. Schwieger und Tebbe (1998) beschrieben diese aus der medizinischen Forschung stammende „Fingerprintmethode“ erstmals für die Untersuchung bakterieller Gemeinschaften. Das Prinzip beruht auf der Eigenschaft von einzelsträngiger DNA, unter nicht-denaturierenden Bedingungen sequenzspezifische Sekundärstrukturen zu bilden. Auf Grund dieser spezifischen Strukturen ist es nun möglich, ein Gemisch unterschiedlicher DNA-Einzelstränge über ein Polyacrylamidgel zu trennen. Die besten Auftrennungseigenschaften wurden bei DNA Einzelsträngen einer Länge von 200-500 Nukleotiden beobachtet (Tebbe *et al.*, 2001). Die in der hier vorliegenden Arbeit durchgeführte SSCP Methode wurde in Anlehnung an das Vorgehen von Dohrmann und Tebbe (2004) durchgeführt.

2.7.3.1 Vorbereitung der Proben für die SSCP

Für die PCR wurde das Primersystem A112f/x036r verwendet (Tabelle 5), wobei der Rückwärtsprimer die für den anschließenden Einzelstrangverdau benötigte

Phosphorylierung am 5' Ende besaß. Der Primer x036r wurde von Leclerc *et al.* (2004) übernommen und modifiziert eingesetzt, indem der ursprüngliche Vorwärtsprimer w036f (Leclerc *et al.*, 2004) als Rückwärtsprimer diente. Die PCR resultierte in der Amplifikation von Fragmenten mit einer Länge von ca. 240 Basen. Als Standard für die SSCP-Methode wurde die DNA aus Reinkulturen von unterschiedlichen Methanogenen parallel zu den Umwelt-DNA-Extrakten aufgearbeitet (Tabelle 8).

Die PCR-Produkte wurden anschließend mit dem QIAquick[®] PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben aufgereinigt und mit 80 µl PCR-Wasser eluiert. Zur Quantifizierung der DNA fand eine photometrische Vermessung bei Wellenlängen von 260 und 280 nm statt (Ultrospec 4000, Amersham Biosciences, Freiburg).

Für den Verdau des phosphorylierten DNA-Stranges, wurden 1000 ng des doppelsträngigen PCR-Produktes (aufgefüllt auf 80 µl) mit 9 µl 10 × λ-Exonuklease-Puffer und 0,6 µl λ-Exonuklease (1000 U, beides Fermentas, St. Leon Rot) für 1,5 h bei 37 °C inkubiert. Der enzymatische Verdau wurde durch Abkühlen auf Eis gestoppt. Die Aufreinigung der verbleibenden Einzelstränge erfolgte zeitnah mit Hilfe des MinElute PCR Purification Kits (Qiagen, Hilden).

Vor dem Beladen des Polyacrylamidgels fand die Denaturierung der Einzelstränge statt, indem das Eluat der zweiten Aufreinigung (ca. 9 µl) mit 9 µl SSCP-Ladepuffer versetzt (10 mM NaOH, 0,25 % [wt/vol] Xylencyanol, 0,25 % [wt/vol] Bromphenolblau, 95 % [wt/vol] Formamid) und anschließend für 2 min auf 95 °C erhitzt wurde.

2.7.3.2 Herstellung des Polyacrylamidgels und Elektrophorese

Da Faktoren wie Temperatur, Pufferkonzentration, Polyacrylamidkonzentration des Gels und Laufzeit der Elektrophorese einen großen Einfluss auf die elektrophoretische Mobilität der Fragmente und das Auflösungsvermögen der SSCP haben, wurden diese Faktoren zunächst entsprechend der Länge der aufzutrennenden 16S rRNA-Genfragmente optimiert. Zur Vorbereitung der Gelgießvorrichtung wurden zwei Glasplatten (20×20×0,4 cm und 20×22×0,4 cm) gründlich mit einem flusenfreiem Tuch und Ethanol 70 % [vol/vol] poliert. Die kürzere Glasplatte (wird nach der Elektrophorese vom Gel gelöst) wurde auf einer Seite mit Antihaf-Spray imprägniert (Sea-Spray, BioLogical, Roth, Karlsruhe), und die längere der beiden Glasplatten wurde auf einer Seite mit 1 ml Bind-Silane-Lösung (10 ml 96 % [vol/vol] Ethanol, 100 µl Bind Silane (Amersham Biosciences, Freiburg), 100 µl 100 % [vol/vol] Essigsäure) beträufelt und eingerieben. Überschüsse dieser Chemikalien auf den Platten wurden mit Ethanol 70 % [vol/vol] vorsichtig entfernt. Die Spacer

(0,35 mm) wurden auf den Rand der beschichteten Seite der längeren Platte gelegt. Die kürzere Platte wurde nun mit der Beschichtung nach innen auf die Spacer aufgelegt (Abbildung 8). Die entstandene „Sandwich“-Struktur wurde mit Hilfe von Klemmen fixiert und horizontal gelagert.

Die Gelmatrix bestand aus 0,725 × MDE Solution (Cambrex Bio Science, Belgien), 10 % Formamid [wt/vol], 1 × TBE Puffer, 4 % [wt/vol] Ammoniumpersulfat (APS) und 0,04 % N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED). Nach Zugabe des APS und des TEMED setzte die Polymerisation ein, und das Gel wurde schnellstmöglich mit Hilfe einer 60 ml Spritze unter Ausschluss von Blasenbildung zwischen die Gelplatten gegossen. Der Vorkamm wurde dann mit der geraden Seite ca. 1 cm in die Gelmatrix zwischen die Glasplatten eingeführt und mit Klemmen fixiert. Nach 4 stündiger Polymerisation wurde der Vorkamm entfernt und durch einen Haifischkamm ersetzt, wobei die Zinken ca. 2 mm in die Polyacrylamidmatrix gedrückt wurden (Abbildung 8). Das Gel wurde nun in die Elektrophoresekammer (Protean[®] II Xi Cell, Biorad, München) eingespannt und die Puffertanks mit 1 × TBE befüllt. Luftblasen in den Taschen des Haifischkammes wurden mit einer Spritze entfernt. Durch eine Kühlvorrichtung (Chef-DR[®] III System, Biorad, München) war es möglich, die Temperatur während der Elektrophorese konstant bei 19,5 °C zu halten.

Die denaturierten Proben wurden in die Taschen pipettiert (Standards 3 µl, Proben 4-5 µl) und die Elektrophorese fand für 12 h bei einer Geräteeinstellung von 40 mA, 50 W und einer konstanten Spannung von 450 V statt (2297 Macrodrive, Constant Power Supply, LKB Bromma, Schweden).

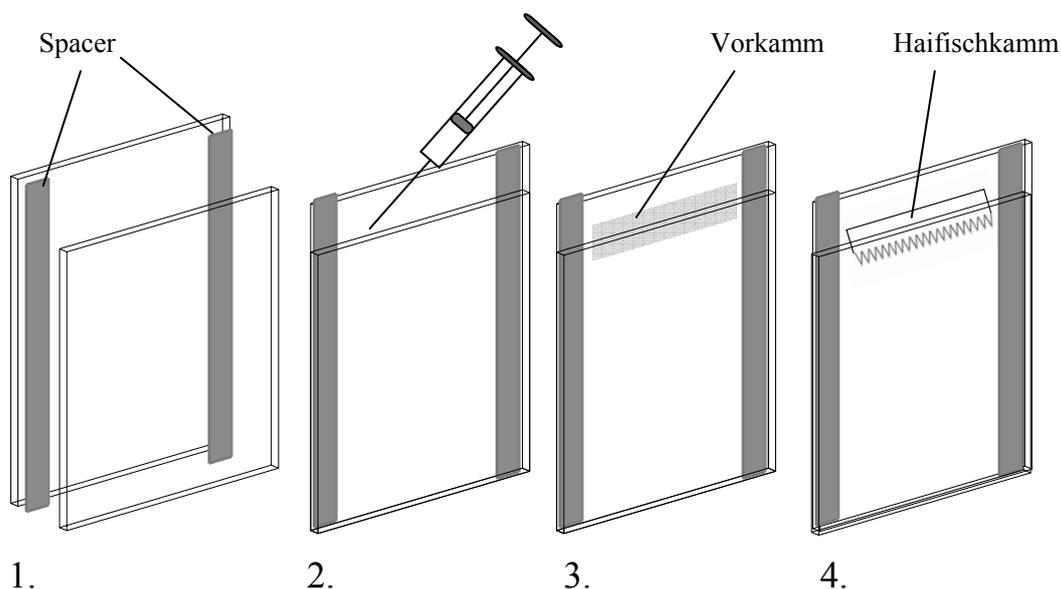


Abbildung 8
Schematischer Ablauf zum Gießen eines Polyacrylamidgels.

2.7.3.3 Silberfärbung der DNA und Clusteranalyse der Bandenmuster

Um die elektrophoretisch aufgetrennten DNA Einzelstränge auf dem Polyacrylamidgel sichtbar zu machen, wurde die DNA mit Silbernitrat angefärbt (Bassam *et al.*, 1991). Die beiden Glasplatten wurden hierfür voneinander getrennt, wobei das Gel auf der längeren Platte haften blieb. Die Glasplatte mit dem Gel wurde nun in eine Stahlwanne gelegt und zur Fixierung der DNA für 30 min mit 300 ml 10 %iger [vol/vol] Essigsäure unter leichtem Schwenken (20 rpm, CAT, ST 5 M, Zipperer GmbH, Staufen) inkubiert. Nach Fixierung der DNA wurde die Essigsäure abgegossen und das Gel in der Stahlwanne dreimal mit 300 ml Reinstwasser für 3 min gespült. Anschließend wurde die Färbelösung zugegeben. Nach 30 minütiger Inkubation bei horizontalem Schütteln (20 rpm) unter Lichtausschluß wurde erneut für 10 s mit Reinstwasser gespült, das Gel von der Rückseite abgewaschen und in eine zweite Stahlwanne mit Entwicklerlösung gelegt, bis die DNA-Bandenmuster sichtbar wurden. Um die Reaktion zu stoppen, wurde das Gel wieder in die erste Stahlwanne, gefüllt mit Essigsäure (10 % [vol/vol]), überführt. Nach 4 minütiger Farbfixierung wurde das Gel abschließend 30 min in Reinstwasser gewaschen. Luftgetrocknet wurde das Gel dann gescannt (PowerLook 1120, UMAX, Willich). Die digitalisierten Bilder wurden nun in das GelCompar II Programm Version 3.5 (Applied Maths, Kortrijk, Belgien) geladen. Zur Ableitung der Bandenmusterähnlichkeiten wurde der „Dice“ Koeffizient eingesetzt, wobei das anschließende „Clustern“ mit Hilfe des WARD Algorithmus stattfand. Hierbei wurden als Einstellung eine maximale Toleranz von 1,0 % und eine Optimierung von 0,5 % gewählt.

Färbelösung:

Silbernitrat	0,5 g
Reinstwasser	0,5 l
Formaldehyd	0,75 ml (erst kurz vor dem Gebrauch zugeben)

Entwickler:

Natriumcarbonat	10,34 g
Reinstwasser	0,5 l
Formaldehyd	1,0 ml
Kühl aufbewahren und kurz vor Gebrauch	
Natriumthiosulfat	0,5 ml hinzugeben

2.7.4 Klonierung

Die Klonierung wurde in dieser Arbeit mit drei unterschiedlichen Zielen durchgeführt:

- (A) Identifikation der methanogenen *Archaea*-Gemeinschaft in CC Kompostmaterial
- (B) Zuordnung der einzelsträngigen Genfragmente aus einer SSCP-Bande
- (C) Spezifitätsüberprüfung der selbst entwickelten Primersysteme

Umgehend nach der Amplifikation des gewünschten Abschnittes der 16S rRNA-Genabschnittes bzw. der Reamplifikation der einzelsträngigen 16S rRNA-Genfragmente aus den SSCP-Banden (Tabelle 6) wurde das PCR Produkt aufgereinigt und mit dem pGEM®-T Vector System II Kit (Promega, Madison, USA) kloniert.

2.7.4.1 Aufreinigung der PCR-Produkte

Um die PCR-Produkte von Resten der Master-Mix Komponenten (Tabelle 6) zu reinigen, wurde das QIAquick® PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden) eingesetzt. Die Aufreinigung fand entsprechend der Angaben des Herstellers statt. Die DNA wurde mit 30 µl PCR Wasser von der Säule eluiert.

2.7.4.2 Durchführung der Klonierung mit unterschiedlichen Proben

Die Ligation des 16S rRNA-Genabschnittes in den pGEM® Vektor fand über Nacht bei 4 °C statt. Das Reaktionsgemisch enthielt pro Ligationsansatz 4 µl aufgereinigtes PCR Produkt, 5 µl 2× Rapid Ligation Buffer, 0,5 µl T4 DNA-Ligase und 0,5 µl pGEM® Vektor (Promega, Hilden, alles im Kit vorhanden). Für die anschließende Transformation wurden 25 µl JM 109 chemisch kompetente *E.coli* Zellen (Promega, Hilden, im Kit vorhanden) zu 4 µl des Ligationsansatzes pipettiert und nach einer Hitzeschockbehandlung für 50 s bei 42 °C mit 475 µl SOC-Medium für 1,5 h bei 37 °C auf dem Schüttler (220 rpm, Titramax 100, Heidolph, Schwabach) inkubiert. Anschließend wurde dieser Transformationsansatz auf Nährmedien-LB-Platten (s.u.) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C bebrütet. Am nächsten Tag konnten die Klone, die den 16S rRNA-Genabschnitt in ihr Plasmid eingebaut hatten („Insert“), über eine Blau/weiß-Selektion ausgewählt werden.

Luria-Bertani-Agar (LB-Medium):

1,0 %	Trypton
0,5 %	Hefeextrakt
1,0 %	NaCl
1,5 %	Agar

Alle Zutaten wurden miteinander vermischt und mit 2 N NaOH auf einen pH-Wert von 7-7,5 eingestellt.

Nach dem Autoklavieren wurden

Ampicillin	Endkonzentration im Medium $75 \mu\text{g ml}^{-1}$
X-Gal	Endkonzentration im Medium $80 \mu\text{g ml}^{-1}$
IPTG	Endkonzentration im Medium 0,5 mM

zugemischt.

A. Klonierung der *Archaea* spezifischen von 16S rRNA-Genfragmenten aus CC Kompostmaterial unterschiedlichen Alters

Aus drei verschiedenen alten CC Materialien (6 Wochen, 8 Wochen alter und reifer Kompost) wurde DNA extrahiert (Abschnitt 2.7.1). Die darin enthaltenen 16S rRNA-Genabschnitte wurden nun mit Hilfe des Primerpaares A112f/A934b amplifiziert. Ausgehend von diesen PCR-Produkten wurde die Klonierung entsprechend Abschnitt 2.7.4 durchgeführt (Insert ca. 820 Basen lang). Pro Klonierungsansatz bzw. Kompostprobe, wurden 50 weiße *E. coli*-Kolonien mit einem sterilen Zahnstocher (handelsüblich, autoklaviert) gepickt. Dieser wurde einmal punktförmig in ein steriles Reaktionsgefäß aufgebracht („gedippt“) sowie zusätzlich auf eine neue LB-Platte. Diese LB-Platte wurde wiederum bei 37 °C über Nacht inkubiert, um so das Zellmaterial des ausgewählten Klones für weitere Untersuchungen zu konservieren. Um die Klone auf das gewünschte Insert hin zu überprüfen, wurde eine sogenannte „Klondip“-PCR durchgeführt, indem direkt auf das Zellmaterial der entsprechende Mastermix pipettiert wurde (Tabelle 6). Von 50 positiven Klonkolonien mit Insert, die weiteren Untersuchungen zur Verfügung stehen sollten, wurden Glycerinstocks angelegt (700 μl Übernacht-Flüssigkultur der entsprechenden Klonkultur + 300 μl Glycerin, Lagerung bei -80 °C).

B. Subklonierung der 16S RNA-Genfragmente aus SSCP Banden

Die DNA Banden wurden nach der „crush and soak“-Methode von Dohrmann und Tebbe (2004) aus dem Gel extrahiert. Das 16S rRNA-Genfragment wurde nun über eine PCR mit

den initial für die PCR-SSCP verwendeten Primern A112f/x036r reamplifiziert werden. Die Klonierung fand entsprechend Abschnitt 2.7.4 statt (Insert ca. 240 Basen lang). Von 20 positiven Klonen mit Insert, die weiteren Untersuchungen zur Verfügung stehen sollten, wurden Glycerinstocks angelegt (Lagerung bei -80 °C).

C. Klonierung zur Spezifitätsüberprüfung entwickelter Primer

Die PCR, von der die Klonierung ausging, wurde entsprechend mit den Primersystemen Mcth983f/Mg1200r, Ms628f/Ms821r und Mtb836f/Mb1174r (Tabelle 5) durchgeführt. Für jedes Primersystem wurde ein Gemisch aus folgenden DNA-Extrakten jeweils im Verhältnis 1:1:1, als „Template“ in die PCR eingesetzt: CC 4 Wochen alt, NC reif, NC 19 Wochen alt für das *Methanoculleus thermophilus* spezifische Primersystem (Fragmentlänge ca. 237 bp); NC reif, CC 4 Wochen alt, CC reif für das *Methanosarcina thermophila* spezifische Primersystem (Fragmentlänge ca. 216 bp); NC 4 Wochen alt, NC 19 Wochen alt, CC 4 Wochen alt für das *Methanothermobacter thermoautotrophicum* spezifische Primersystem (Fragmentlänge ca. 367 bp). Die Klonierung fand entsprechend Abschnitt 2.7.4 statt.

2.7.4.3 RFLP Analyse – Restriction Fragment Length Polymorphism

A. Verdau der 16S rRNA-Genfragmente aus CC Kompostmaterial unterschiedlichen Alters

Zur Überprüfung der Diversität in den drei unterschiedlich alten Kompostmaterialien, wurden je 50 Klone in zwei getrennten Reaktionen in einen Verdau mit den Restriktionsenzymen Hha I bzw. Bsu RI (beide MBI Fermentas, St. Leon Rot) eingesetzt. Dafür wurden jeweils 5 µl PCR-Produkt der Klondip-PCR (Abschnitt 2.7.4.2) mit 12,9 µl PCR-Wasser, 2 µl 10× Reaktionspuffer (MBI Fermentas, St. Leon Rot, mit Enzym geliefert) und 0,1 µl des entsprechenden Enzyms zusammen pipettiert. Anschließend wurden diese Ansätze für 5 h bei 37 °C (MyCycler™, Biorad, München) inkubiert. Die Auswahl der unterschiedlichen Klone zur Sequenzierung erfolgte visuell über die jeweiligen Bandenmuster nach einer Auftrennung der unterschiedlich langen DNA Fragmente über ein 2,75 %iges Agarosegel. Die Ergebnisse wurden so interpretiert, dass im günstigsten Fall jedes unterschiedliche Schnittmuster ein anderes Insert und somit ein anderes 16S rRNA-Genfragment aus der Umweltprobe darstellte. Um sicherzugehen, eine

Unterschätzung der Diversität auszuschließen, wurden pro identisches Schnittmuster je zwei Klone für die Plasmidextraktion und anschließende Sequenzierung ausgewählt.

B. Subklonierung der 16S RNA-Genfragmente aus SSCP Banden

Für die Selektion der Klone aus den SSCP-Bandenextrakten wurde pro Bandenausschnitt ein Verdau mit 13 Klonen durchgeführt (Restriktionsenzym Hpa II, gleiche Bedingungen für den Verdau wie unter A; MBI Fermentas, St. Leon Rot). Pro Schnittmuster wurde ein Klon für die folgende Plasmidextraktion ausgesucht.

C. Klonierung zur Spezifitätsüberprüfung entwickelter Primer

Für die Differenzierung der Klone zur Spezifitätsüberprüfung der entwickelten Primersysteme, wurde je Probe ein Verdau mit 50 Klonen durchgeführt. Die Auswahl der Restriktionsenzyme erfolgte hier mit Hilfe der online verfügbaren Software Insilico (insilico.ehu.es/restriction/). Es wurden Restriktionsenzyme ausgewählt, die es durch ihre Erkennungssequenz virtuell ermöglichen, spezifische von unspezifisch amplifizierten „Templates“ zu unterscheiden. Für das *Methanosarcina thermophila*- spezifische Primersystem wurden die 16S rRNA-Genfragmente mit dem Restriktionsenzym Alw26 I für 2,5 Stunden bei 37 °C verdaut (zu erwartende Fragmentlängen bei spezifischem Produkt: 134 bp und 82 bp). Für das *Methanoculleus thermophilus*- bzw. *Methanothermobacter* sp.- spezifische Primersystem fand der Verdau mit BspP I für 2,5 h bei 55 °C statt (zu erwartende Fragmentlängen bei spezifischem Produkt: 139 bp, 78 bp und 21 bp bzw. bei *Mtb.* sp. nur ein einzelnes Fragment von 368 bp). Von den so erhaltenen Banden mustern, wurden je 10 Klone für die Plasmidextraktion ausgewählt.

2.7.4.4 Plasmidextraktion

Die für eine spätere Sequenzierung ausgewählten Klone bzw. *E. coli* Kolonien wurden über Nacht in flüssigem LB-Medium (Abschnitt 2.7.4.2, ohne X-Gal) angezogen. Nach dem Abzentrifugieren der Zellen, wurden aus diesen die Plasmide extrahiert. Hierfür wurde die Methode der alkalischen Lyse mit SDS angewendet (Sambrook und Russel, 2001). Im Anschluss wurde der Plasmidgehalt im Extrakt photometrisch quantifiziert (siehe auch Abschnitt 2.7.3.1). Anschließend wurde die Konzentration mit PCR-Wasser auf 100 ng μl^{-1} eingestellt.

2.7.5 Sequenzierung und „phylogenetische“ Analyse

Die Sequenzierung nach Sanger *et al.* (1977) wurde als Auftragsarbeit am Institut für Mikro- und Molekularbiologie durchgeführt. Für die Sequenzierreaktion wurde das BigDye[®] Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Darmstadt) verwendet. Für längere Inserts (über 450 bp) wurden die Primer M13f und M13r Primer (Tabelle 5) in zwei getrennten Reaktionen eingesetzt. Für kürzere Inserts wurde nur der Primer M13f genutzt, um die volle Sequenz des Inserts zu erfassen. Die Produkte der Sequenzierreaktionen wurden abschließend mit dem Abi Prism[®] 310 Genetic Analyser (Applied Biosystems, Darmstadt) analysiert.

Die Rohsequenzen wurden mit dem im MEGA 3 Programm (Kumar *et al.*, 2004) integrierten ClustalW Programm (Thompson *et al.*, 1994) zusammen mit den entsprechenden 16S rRNA-Gen spezifischen Primersequenzen aligned. Reste der Plasmidsequenz konnten so *in silico* abgeschnitten werden. Die korrigierten Sequenzen wurden anschließend mit Sequenzen der NCBI Datenbank (National Center for Biotechnology Information) verglichen (BLASTn 2.2.14, Basic Local Alignment Search Tool, www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) und mit den hier gefundenen nächst ähnlichen Sequenzen erneut aligned.

Für die „phylogenetischen“ Berechnungen wurde die Neighbour-Joining Methode mit 1000 „Boostrap“-Wiederholungen oder die Maximum Parsimony Methode, beide in MEGA 3 integriert, angewendet. Für eine phylogenetische Berechnung mit der Maximum Likelihood Methode wurde die Software Treefinder (www.treefinder.de, Jobb, 2005) eingesetzt.

2.7.6 Statistische Analyse

Zur statistischen Auswertung der klonierten 16S rRNA-Genfragmente aus dem 6 Wochen, 8 Wochen alten und reifen CC Kompost wurde die „Rarefaction“-Analyse (Version 1.3, www.uga.edu/~strata/software/index.html) angewendet (Simberloff, 1978). Diese Analyse läßt grobe Abschätzungen darüber zu, ob eine ausreichende Menge an Klonen untersucht wurde, um die Diversität der im Kompost vorhandenen archaellen 16S rRNA-Gene wiederzugeben. Zur Ergänzung wurden weitere Diversitäts-Indizes („Coverage“ C, „Evenness“ E, Shannon Index H') nach den folgenden Formeln berechnet.

- (1) $C = 1 - (n/N) \times 100$ (Good, 1953)
- (2) $H' = -\sum P_i \ln P_i$ (Shannon und Weaver, 1949)
- (3) $E = H' / \ln(S)$

N: Sequenzen insgesamt

n: Zahl der „einzigartigen“ Sequenzen

n_i : Zahl der Sequenzen/Klone innerhalb jeder einzelnen detektierten Spezies

P_i : n_i / N

S: Anzahl an detektierten Spezies („Speziesreichtum“)

2.7.7 Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP)

Die T-RFLP Analyse erfolgte gemäß Lueders *et al.* (2001) an 6 Wochen, 8 Wochen altem und reifen CC Kompost. Die Versuchsdurchführung ausgehend von der PCR wurde als Auftragsarbeit von der Firma NADICOM (Gesellschaft für Angewandte Mikrobiologie mbH, Marburg) durchgeführt. Die PCR fand mit den Primern A109f/A915r (A915r markiert mit Carboxyfluorescein) statt. Das PCR-Produkt wurde mit dem Enzym TaqI (Promega, Mannheim) verdaut, um die fluoreszenzmarkierten terminalen Restriktionsfragmente (T-RFs) anschließend über eine Elektrophorese aufzutrennen und mit Hilfe eines automatischen Sequenziergerätes zu visualisieren. Die relative Häufigkeit der detektierten T-RFs wurde über ihre Peakfläche bestimmt (Auswertung aller Peaks mit einem Anteil von > 1 % an der gesamten Peakfläche). Die Zuordnung der T-RFs zu den einzelnen Spezies über die Suche der zugehörigen Fragmentlängen wurde über einen computersimulierten Verdau via „Ribosomal Database“ (RDP II, rdp8.cme.msu.edu/html/index.html) und „Microbial Community Database“ (MICA 3, mica.ibest.uidaho.edu/trflp.php) durchgeführt.

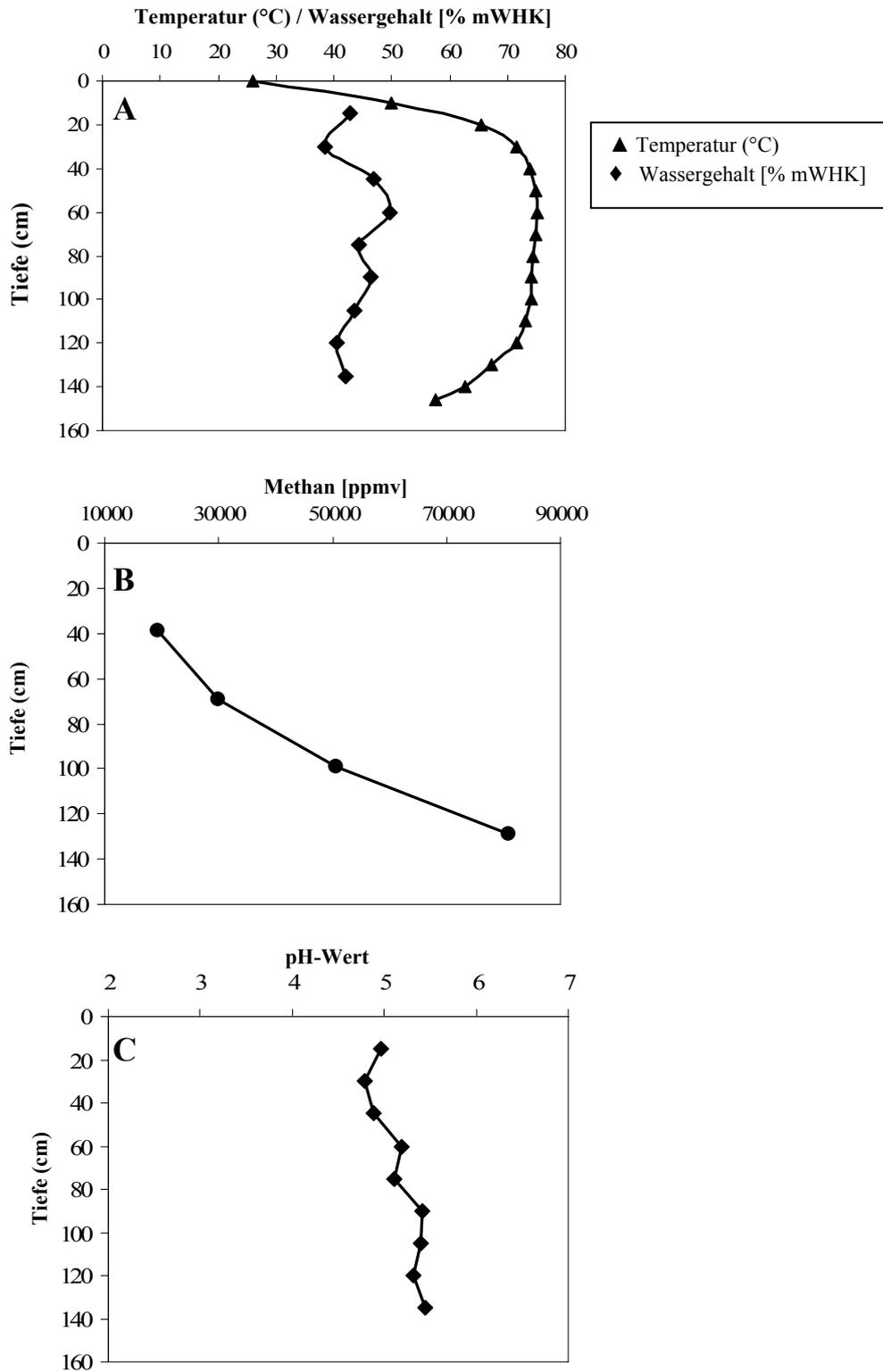
3. Ergebnisse

3.1 *In situ* Methankonzentration, Temperatur, pH-Wert und Wassergehalt im Tiefenprofil einer 6 Wochen alten CC Kompostmiete

Die Analyse von Gasproben aus unterschiedlichen Tiefen einer 6 Wochen alten Kompostmiete zeigte, dass die Methankonzentration mit zunehmender Tiefe anstieg. Die höchste Konzentration wurde mit 8×10^4 ppmv Methan in einer Tiefe von 130 cm gemessen (Abbildung 9 B). Die Sauerstoffkonzentration lag in allen Gasproben unter der Nachweisgrenze. Der pH-Wert und Wassergehalt blieben in den verschiedenen Tiefen relativ konstant. Hierbei lag der pH-Wert in einer Spanne von 4,9 bis 5,4 und der Wassergehalt in % der mWHK in einem Bereich von 38-49 (Abbildung 9 A und C). Auch die Temperatur zeigte sich in einer Tiefe von 30 bis 120 cm konstant zwischen 71 °C und 75 °C (Abbildung 9 A). Die niedrigste Temperatur in der Miete wurde bei 146 cm Tiefe mit 57,5 °C gemessen. An der Oberfläche des Komposts wurde eine Temperatur von 26 °C vermerkt. Die Aussentemperatur betrug 13 °C.

3.2 Potentielle Methanbildung verschiedener Komposte und Mist

Um einen Einblick in die allgemeine Verbreitung von thermophilen Methanogenen in Komposten zu erlangen, wurden neun, nach unterschiedlichen Methoden hergestellte und „gereifte“ Komposte, auf Methanbildung bei 36 °C, 50 °C, 65 °C und 80 °C untersucht. Im Vergleich zu den Methanbildungsraten bei 50 °C waren die gebildeten Methanmengen bei 36 °C in allen Materialien relativ gering. Das HC Material zeigte bei 36 °C und 65 °C keine methanogene Aktivität (Tabelle 9). Bei 80 °C konnte in keiner der anoxischen Inkubationen eine signifikante Methanbildung festgestellt werden. Im TC und AC Material, beide mit Bioabfall als Ausgangsmaterial hergestellt, konnte mit 2,8 bzw. 1,3 $\mu\text{mol CH}_4 \text{ g-Tg}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ein Optimum der potentiellen Methanbildung bei 65 °C detektiert werden (Tabelle 9). Diese Raten waren die höchsten, die während dieses Experimentes beobachtet werden konnten. Alle anderen Materialien, auch das des Misthaufens (PS), zeigten eine maximale Methanbildung bei 50 °C. Während der Inkubation des Gartenkomposts (GC) bei 50 °C konnten nach 53 h 1,13 $\mu\text{mol CH}_4 \text{ g-Tg}^{-1}$ gemessen werden.

**Abbildung 9**

Tiefenprofil der Temperatur und des Wassergehaltes (A), der *in situ* Methankonzentration (B) und des pH-Wertes (C) einer 6 Wochen alten CC Kompostmiete. Alle Werte resultieren aus Einzelbestimmungen.

Tabelle 9

Übersicht von pH-Werten, Wassergehalten und Methanbildungsraten von reifen Komposten die über verschiedene Prozessführungen hergestellt wurden (siehe auch Tabelle 2).

Material	pH-Wert	GW %	nmol CH ₄ g-TG ⁻¹ h ⁻¹			
			36 °C	50 °C	65 °C	80 °C
Kompost CC	7,2	67,2	20,2± 5	340,2±42	320,9±50	0,0
Kompost NC	8,1	46,4	1,5±0,3	10,1±2	4,0±0,7	0,0
Kompost TC	7,7	23,9	40,6±5	120,6±30	2750,7±135	0,0
Kompost AC	7,3	61,1	90,0±8	470,0±20	1330,8,6±70	0,0
Kompost HC	7,4	162,2	0,0	20,5±3	0,0	0,0
Kompost MC	7,0	34,9	1,2±0,1	88,7±5	10,5±4	0,0
Kompost UC	7,4	42,1	1,0±0,0	977,7±8	18,5±0,4	0,0
Kompost SC	7,6	103,4	6,3±0,0	48,5±12	21,1±1	0,0
Kompost PC	7,7	34,8	148,9±45,5	920,1±30	56,3±1	0,0
Mist PS	8,1	75,3	92,7±3	791,0±71	31,5±12	0,0

3.3 Quantifizierung von *Archaea* in CC Kompostmaterial

Die Quantifizierung methanogener *Archaea* über die Methanbildungsrate in 6 Wochen altem CC Kompostmaterial ergab eine Zellzahl von 6×10^7 Methanogenen g-TG⁻¹. Über die Methode der MPN-PCR konnten ähnlich hohe Zellzahlen für *Archaea* von $0,2 - 4 \times 10^7$ detektiert werden. Mit der gleichen Methode wurde für *Bacteria* eine Zellzahl von 10^{11} Zellen g-TG⁻¹ festgestellt.

3.4 Diversität methanogener *Archaea* in Kompost und Veränderungen in der methanogenen Population während des Kompostierungsprozesses

3.4.1 Veränderung der Temperaturoptima für die potentielle Methanbildung in unterschiedlich alten CC Kompostmaterialien

Um die Veränderung der methanogenen Gemeinschaft im Verlauf der Kompostierung zu dokumentieren, wurde CC Kompostmaterial einer 6 Wochen, 8 Wochen alten und einer reifen Kompostmiete bei unterschiedlichen Temperaturen anoxisch inkubiert. Die *in situ* Temperaturen an den drei Probenahmepunkten (Tiefe ca. 20 cm) der jeweiligen Miete lagen in einem Bereich von 62,0-64,5 °C in der 6 Wochen alten Miete, 61,5-62,0 °C in der 8 Wochen alten Miete und 50,0-52,3 °C in der fertigen Kompostmiete.

Während der Inkubation, wurde im 6 Wochen alten und 8 Wochen alten Kompost mit steigender Temperatur auch eine Zunahme der potentiellen Methanbildung beobachtet.

Dieser Trend ließ sich für den reifen Kompost nicht feststellen. Für alle drei untersuchten Materialien ließ sich eine optimale potentielle Methanbildung bei 60 °C feststellen (Abbildung 10). Diese lag im 6 Wochen alten Material bei 590 nmol g-FG⁻¹h⁻¹, im 8 Wochen alten 149 nmol g-FG⁻¹h⁻¹ und im fertigen Kompost bei 32 nmol g-FG⁻¹h⁻¹. Bei 70 °C war die Methanbildungsrate des 6 Wochen alten Materials mit 521 nmol g-FG⁻¹h⁻¹ fast so hoch wie bei 60 °C, wohingegen im 8 Wochen alten Material kaum, und im reifen Kompostmaterial gar keine methanogene Aktivität bei 70 °C zu detektieren war.

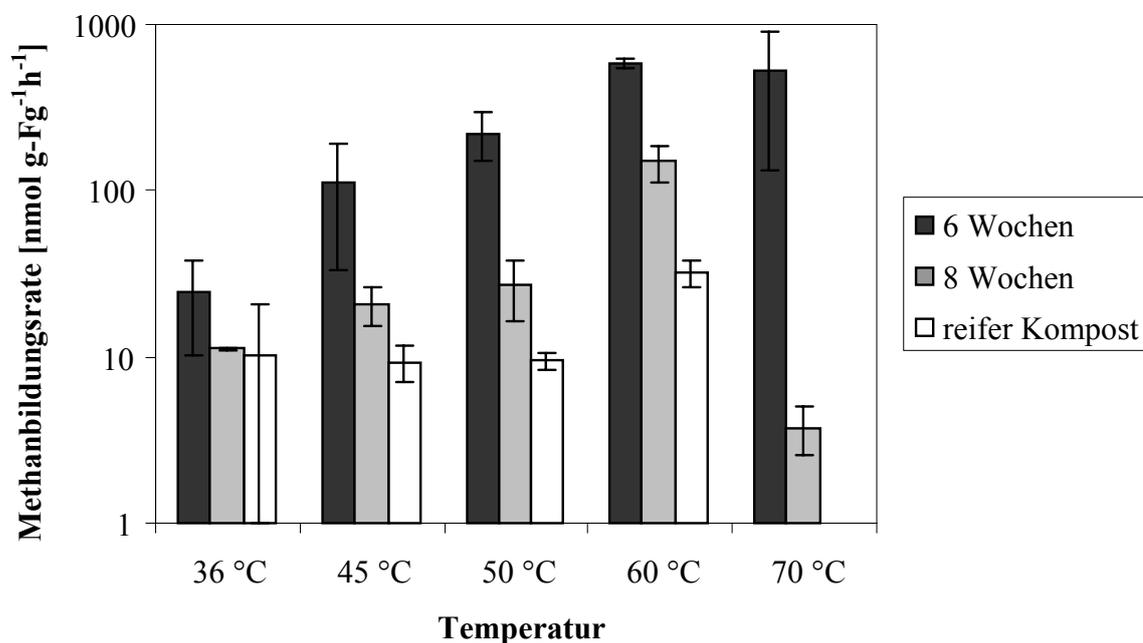


Abbildung 10

Potentielle Methanbildungsraten von 6 Wochen, 8 Wochen altem und reifen CC Kompostmaterial in Abhängigkeit von der Inkubationstemperatur. Die Raten sind als Mittelwerte (n=3) ± SA aufgetragen.

3.4.2 Klonierungsanalyse - CC Kompost

Um die Struktur der methanogenen Gemeinschaft im Kompostmaterial zu untersuchen, wurde die Zusammensetzung der *Archaea*-Biozönose in 6 Wochen, 8 Wochen altem und reifen CC Kompostmaterial mittels Klonierung der in den Materialien vorhandenen 16S rRNA-Gene analysiert. Nach der Durchführung eines RFLP-„Fingerprints“ und anschließender Sequenzanalyse der Klone, wurden unterschiedliche „operational taxonomic units“ (OTUs) bestimmt. Als Speziesgrenze und OTU Abgrenzung wurde eine Sequenzähnlichkeit von ≥ 98 % festgelegt.

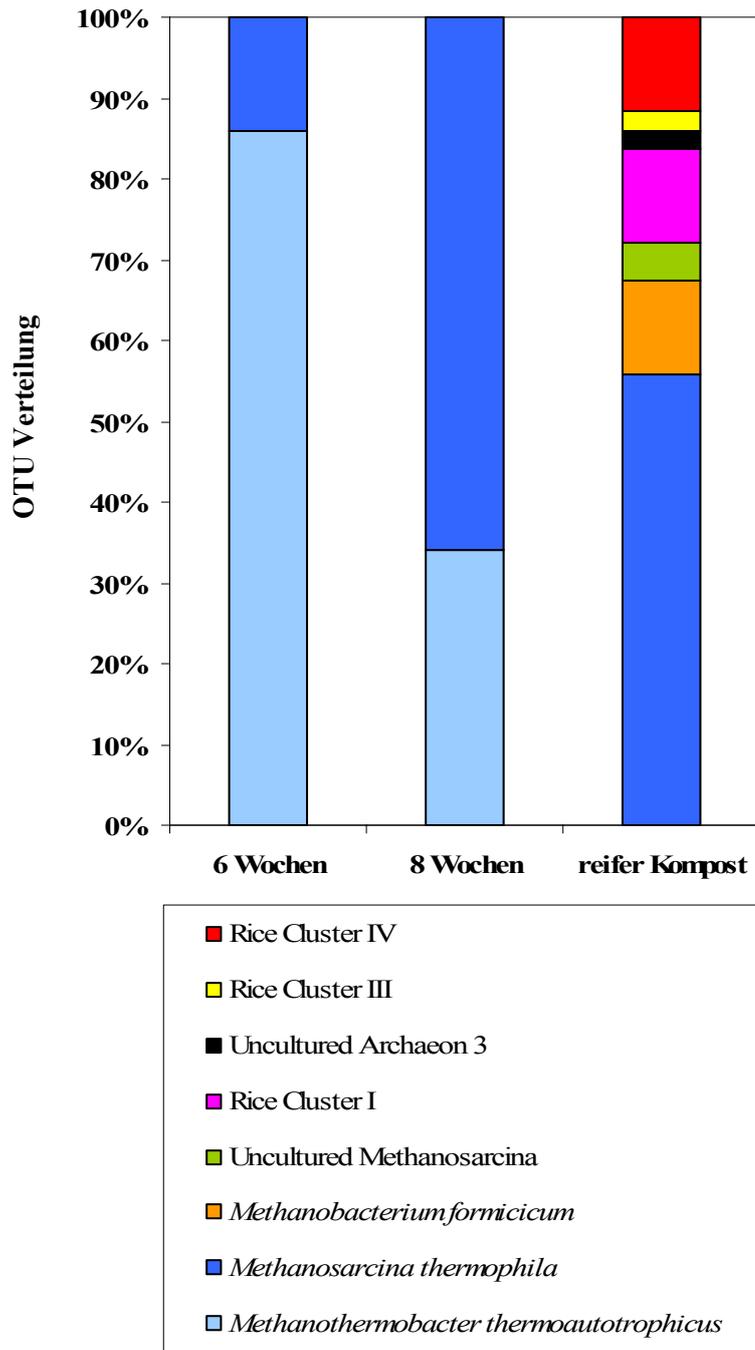


Abbildung 11

Aufteilung der 16S rRNA-Gene der *Archaea* in 6 Wochen, 8 Wochen altem und reifen CC Kompostmaterial und Häufigkeit des Vorkommens in % der Gesamtanzahl an analysierten Klonen.

Insgesamt konnten 86 % der Klone aus dem 6 Wochen alten Material einem OTU zugeordnet werden. Sie zeigten die höchste Sequenzähnlichkeit (99 %) zu Spezies der Gattung *Methanothermobacter* (Abbildung 11, Abbildung 13). Im Gegensatz dazu konnte dieses OTU nur mit einem Anteil von 34 % in 8 Wochen alten Material und gar nicht im reifen Kompost nachgewiesen werden.

Klone des vorherrschenden OTU im 8 Wochen alten Kompost (66 %) zeigten 98 % Sequenzähnlichkeit zu *Methanosarcina thermophila*. Das entsprechende OTU machte im 6 Wochen alten Material einen Anteil von 56 % und im reifen Material von 14 % aus. Dieses OTU war das einzige welches in allen drei Materialien detektierbar war.

In reifem Kompostmaterial konnten 11,6 % der Klone einem OTU zugeordnet werden, dessen Sequenz die höchste Ähnlichkeit zu *Methanobacterium formicicum* zeigte. Weitere 11,6 % der Klone gehörten zu einem OTU, welches vermutlich durch Mitglieder des Rice Cluster I repräsentiert wurde. Die gleiche Anzahl analysierter Klone wurde dem OTU zugeordnet, dessen Sequenz den *Crenarchaea* des Rice Cluster IV am ähnlichsten war. Von den verbleibenden 9,2 % der OTUs konnte eins (2,3 %) dem Rice Cluster III zugeordnet werden, und zwei (4,7 % und 2,3 %) zeigten Ähnlichkeit zu Sequenzen unkultivierter *Methanosarcina* Spezies („uncultured“ *Methanosarcina* und „uncultured“ Archaeon 3, Abbildung 11).

3.4.2.1 „Rarefaction“-Analyse

Die „Rarefaction“-Analyse ist eine statistische Methode, mit der abgeschätzt werden kann, ob ausreichend Klone aus einer Probe erfasst wurden, um die tatsächliche Diversität in der Probe wiederzugeben. Für die Klonbibliothek des 6 Wochen und des 8 Wochen alten Kompostmaterials ergab sich, dass die „Rarefaction“-Kurve ihre Sättigung erreicht (Abbildung 12). Für den reifen Kompost wurde die Sättigung der „Rarefaction“-Kurve nicht erreicht.

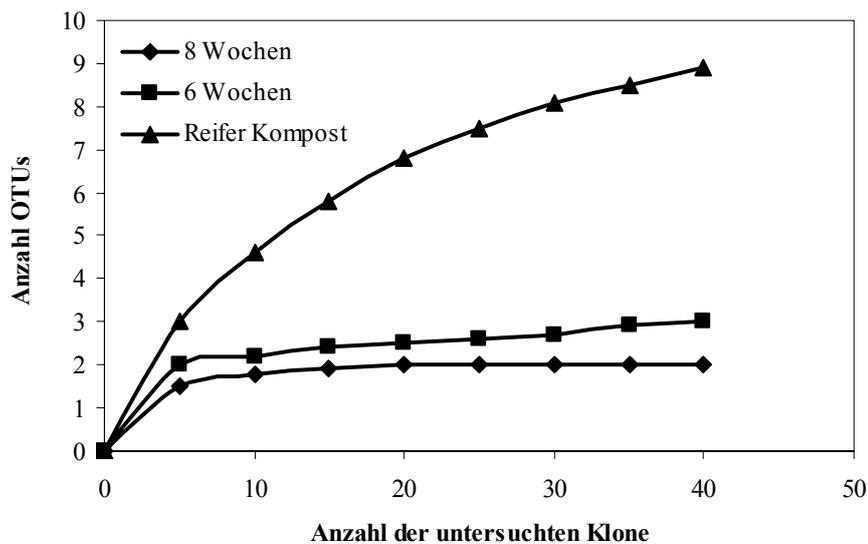


Abbildung 12

„Rarefaction“-Kurven für die verschiedenen RFLP-Muster der 16S rRNA-Genfragmente (OTUs). Sie stellen die zu erwartende Diversität von 16S rRNA-Gen-Klonsequenzen in 6 Wochen, 8 Wochen altem und reifen Kompost dar. Die Kurven wurden mit Hilfe des Freeware Programms „Analytic Rarefaction“ (Version 1.3) berechnet.

3.4.2.2 Diversitätsindizes

Die Spezies Diversität kann betrachtet werden als Gesamtheit zweier Komponenten: der „species richness“ als Maß für die Anzahl an Spezies in einer Gemeinschaft und der „species evenness“ als Kennzahl für die Gleichmäßigkeit der Verteilung der Individuen auf die einzelnen Spezies. Die „Rarefaction“-Analyse stellt in diesem Zusammenhang eine Schätzung dar, inwiefern die „species richness“ sinken würde, wenn die Anzahl an untersuchten Klonen verringert wird. Ein zweiter Ansatz ist die Berechnung der „Coverage“ C. Sie beschreibt, inwiefern die Diversität von Sequenzen in einer definierten Probe sich an die Diversität in einer Probe mit unbegrenzter Anzahl an untersuchten Klonen annähert. Für die Probe des 6 Wochen und 8 Wochen alten Komposts ergaben sich mit dieser Berechnung Werte von 100 %. Folglich wurden mit der Anzahl untersuchter Klone 100 % der Diversität in der Probe detektiert. C für den fertigen Kompost betrug hingegen 95 %. Da bei der „Coverage“-Berechnung aber nur das Verhältnis der Anzahl an einzigartigen Klonen gegenüber der Gesamtheit („species richness“) in die Rechnung miteinbezogen wird und somit die „species evenness“ unberücksichtigt bleibt, kann ein weiterer Ansatz durchgeführt werden: die Berechnung des Shannon Diversity Index H' . Dieser ist insofern aussagekräftiger, da beide, „evenness“ und „richness“, in die Berechnung mit einfließen. Je höher H' , desto diverser die Gemeinschaft im untersuchten Habitat. H'

für den 6 Wochen alten Kompost betrug 0,404, für den 8 Wochen alten 0,642 und für den fertigen Kompost ergab sich ein Wert von 1,394. Die berechnete „Eveness“ E betrug beim 6 Wochen alten Kompost 0,583, beim 8 Wochen alten 0,664 und beim reifen Kompost 0,716. E liegt immer zwischen 0 und 1, wobei eine Annäherung an 1 eine umso größere Gleichmäßigkeit der Verteilung der Individuen auf die Spezies bedeutet.

3.4.2.3 „Phylogenetische“ Analyse

Die phylogenetische Analyse der Sequenzen zeigte, dass sich bei Verrechnung mit anderen Sequenzen aus den öffentlichen Datenbanken ein Cluster bildete, welches ausschließlich aus 16S rRNA-Genen bestand, die aus Proben von Abfallbehandlungsanlagen stammten („WTP-Cluster“, Kompost: KT32, KT33, KT38, KT25 - diese Arbeit; Biogasanlage: 058C07, 059C03, 059A07- Chouari *et al.*, 2005; 65C, 71C – Hougaard und Westermann, nicht veröffentlicht; Abbildung 13). Der Stammbaum wurde nach der „Neighbour Joining“-Methode berechnet (Abbildung 13), aber auch Berechnungen mit „Maximum Parsimony“ und dem „Maximum Likelihood“ Algorithmus bestätigten diese Abspaltung.

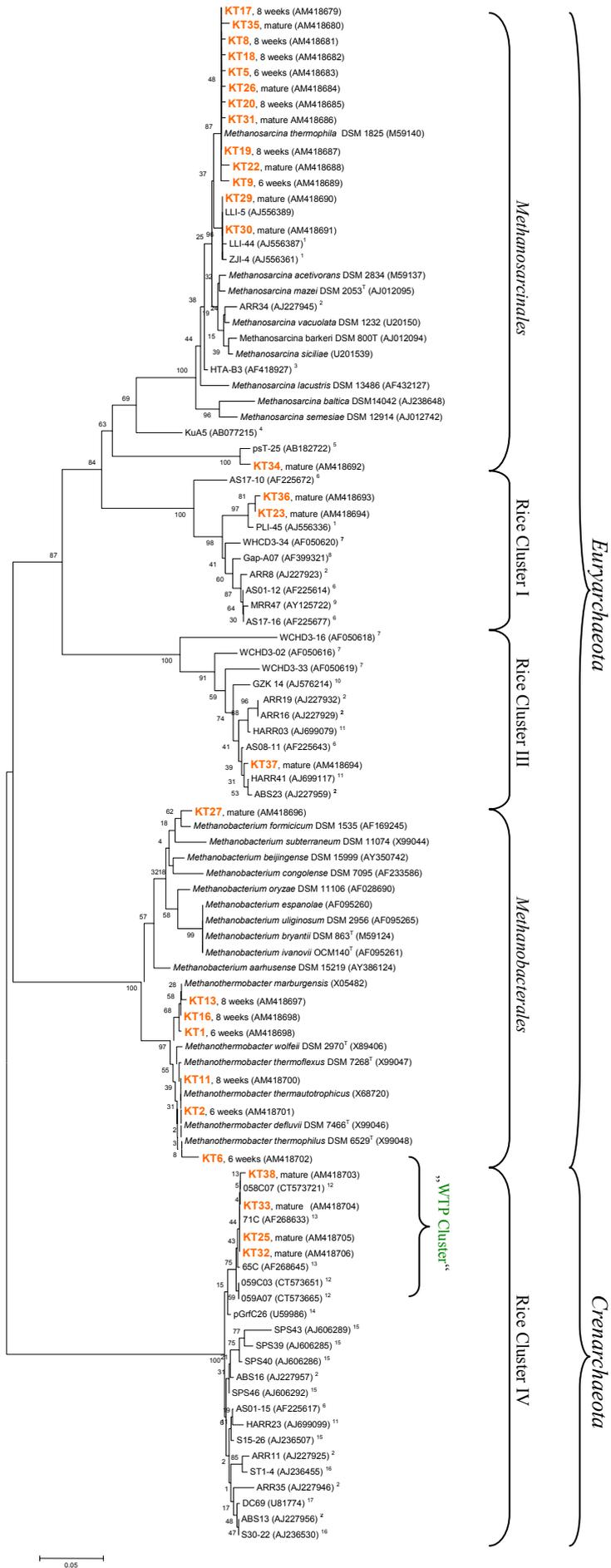


Abbildung 13

Stammbaum, welcher die Position der 16S rRNA-Gen-Klonsequenzen von 6 Wochen, 8 Wochen altem und reifen CC Kompostmaterial in der Domäne der *Archaea* zeigt. Dieses Dendrogramm wurde entsprechend der „Neighbour Joining“-Methode berechnet. Die „Bootstrap“-Werte beruhen auf 1000 Wiederholungen und sind an den Verzweigungen angegeben. Die „Accession“-Nummern sind in Klammern angegeben.

- ¹ ZJI-4, LLI-44, LLI-5, PLI-45: Reisfeldboden nach Adaption an 45 °C (Yang *et al.*, 1998)
- ² ARR34, ARR19, ARR16, ARR8, ARR11, ARR35: Reiwurzeln
ABS23, ABS16, ABS13: Anoxischer Reisfeldboden (Großkopf *et al.*, 1998b)
- ³ HTA-B3: Frischwasser Reservoir (Stein *et al.*, 2002)
- ⁴ KuA5: Höhlen-Grundwasser (Watanabe *et al.*, 2002)
- ⁵ psT-25: Gefluteter Reisfeldboden (Liu *et al.*, unpublished)
- ⁶ AS17-16, AS01-12, AS17-10, AS01-15: Reisfeldboden (Lueders und Friedrich, 2000)
- ⁷ WHCD3-16, WHCD3-02, WHCD3-33, WHCD3-34: Verschmutzter Grundwasserhorizont (Dojka *et al.*, 1998)
- ⁸ Gap-A07: Reisfeldboden (Ramakrishnan *et al.*, 2001)
- ⁹ MRR47: Reiwurzeln (Chin *et al.*, unpublished)
- ¹⁰ GZK14: Sickerwasser einer Mülldeponie (Huang *et al.*, 2003)
- ¹¹ HARR03, HARR41, HARR23: Reiwurzeln (Lu *et al.*, 2005)
- ¹² 058C07, 059C03, 059A07: Biogasanlage (Klärschlamm; Chouari *et al.*, 2005)
- ¹³ 71C, 65C: Biogasanlage (Klärschlamm; Hougaard & Westermann, unpublished)
- ¹⁴ pGrfC26: Sediment aus seichtem Gewässer (Hershberger *et al.*, 1996)
- ¹⁵ SPS43, SPS39, SPS40, SPS46: saures Torfmoor (Kotsyurbenko *et al.*, 2004)
- ¹⁶ S30-22, S15-26, ST1-4: Reisfeldboden (Chin *et al.*, 1999)
- ¹⁷ DC69: anoxischer Klärschlamm (Godon *et al.*, 1997)

3.4.3 Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP) - CC Kompost

Parallel zur Klonierungsanalyse wurde mit dem CC Kompostmaterial auch eine T-RFLP Analyse durchgeführt. Der Vergleich, der aus unterschiedlich alten Kompostmaterialien generierten T-RF Muster (Abbildung 14), zeigte deutliche quantitative Unterschiede in der Zusammensetzung der TR-Fs („terminal restriction fragments“). Im reifen Material konnten 7 dominante Peaks detektiert werden, während es im 8 Wochen alten und 6 Wochen alten Kompost nur 6 Peaks waren. Im Letzteren wurde der vorherrschende T-RF vermutlich durch Spezies der Familie *Methanobacteriaceae* repräsentiert. Der dominante T-RF im 8 Wochen alten Material dagegen konnte Mitgliedern der Familie *Methanobrevibacteriaceae* oder der Spezies *Methanobacterium formicicum* zugeordnet werden. Der T-RF mit einer Länge von 395 bp konnte nur im reifen Kompostmaterial nachgewiesen werden. Hier war eine Zuordnung über die Datenbanken MICA und RDP nicht möglich. Der T-RF mit einer Länge von 86 bp konnte der Gattung *Methanoculleus* zugeordnet werden und war in allen drei Materialien vorhanden, wobei er mit 10 % den höchsten Anteil im 6 Wochen alten Material hatte. Die TR-Fs mit den Längen von 100 bp und 803 bp konnten nach dem Vergleich mit Datenbankeinträgen keinem bekannten Organismus zugeordnet werden.

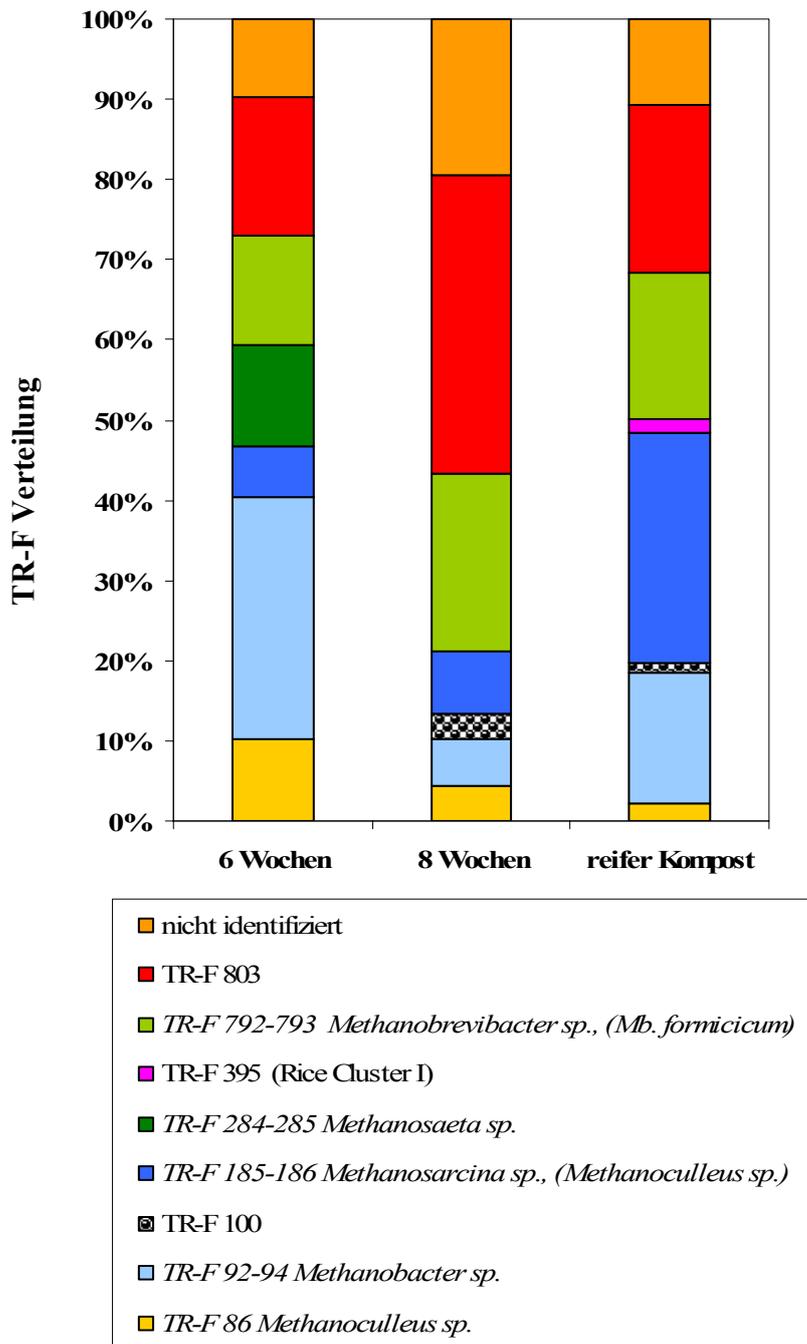


Abbildung 14

Relative Häufigkeit des Vorkommens der unterschiedlichen T-RFs zur Einschätzung der Gemeinschaft der *Archaea* in 6 Wochen, 8 Wochen altem und reifen CC Kompost. T-RFs mit einem prozentualen Anteil von unter 1 % an der Gesamtfläche wurden nicht ausgewertet und sind unter der Bezeichnung „nicht identifiziert“ zusammengefasst. Die Häufigkeiten sind Mittelwerte aus n=3 Peakflächen aller detektierten Fragmente.

3.5 Einflussfaktoren auf die potentielle Methanbildung und die Diversität der methanogenen *Archaea* – CC Kompost

3.5.1 Einfluss der Temperatur auf die *Archaea* Population

Um den Einfluss der Temperatur auf die Gemeinschaft der *Archaea* mit molekularbiologischen Methoden zu untersuchen, wurde fertiges CC Kompostmaterial für 6 Tage jeweils bei 36 °C, 50 °C und 65 °C anoxisch inkubiert. Anschließend wurde die DNA aus den Proben extrahiert, und eine PCR-SSCP Analyse mit dem Primersystem A112f/x036r-PH (Tabelle 5) durchgeführt (Abbildung 15).

Nach einer Cluster-Analyse konnten die Inkubationen bei 65°C und der nicht inkubierte Kompost deutlich voneinander getrennt werden, wobei die Profile der bei 36°C und 55°C inkubierten Proben in ein gemeinsames Cluster fielen (Abbildung 16).

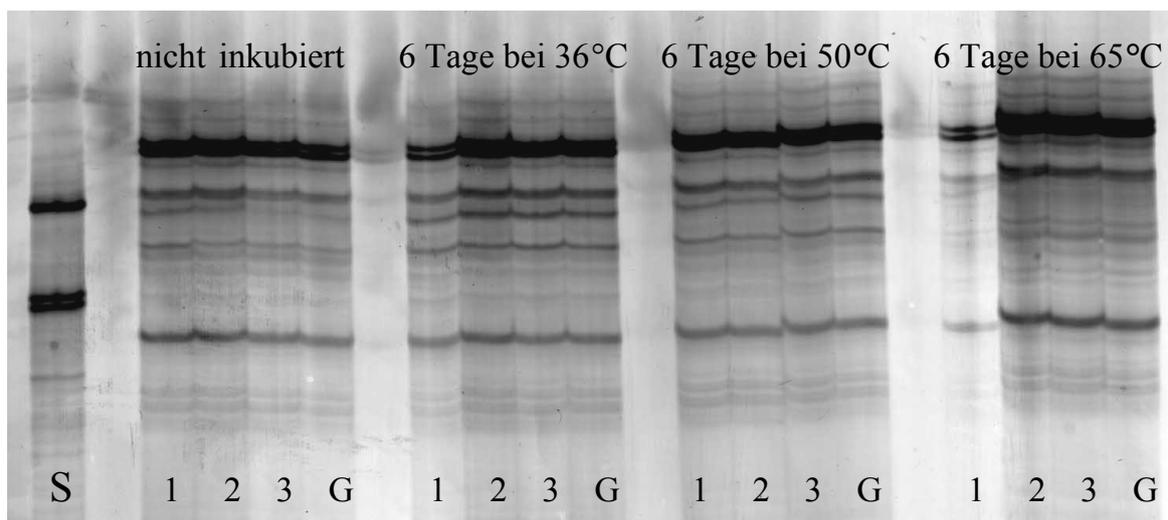


Abbildung 15

SSCP-Gel nach elektrophoretischer Auftrennung der aus fertigem CC Kompost mit den Primern A112f und x036r-PH generierten SSCP-PCR-Produkte. 1-3: Aufgetragen wurden SSCP-PCR-Produkte die aus DNA der drei parallel inkubierten Proben generiert wurden. G: Gemisch der SSCP-PCR-Produkte der Proben 1-3. S: Standardgemisch aus SSCP-PCR-Produkten der Reinkulturen von *Methanothermobacter thermoautotrophicus* (DSM 1053^T) und *Methanothermobacter marburgiense* (DSM 2133^T).

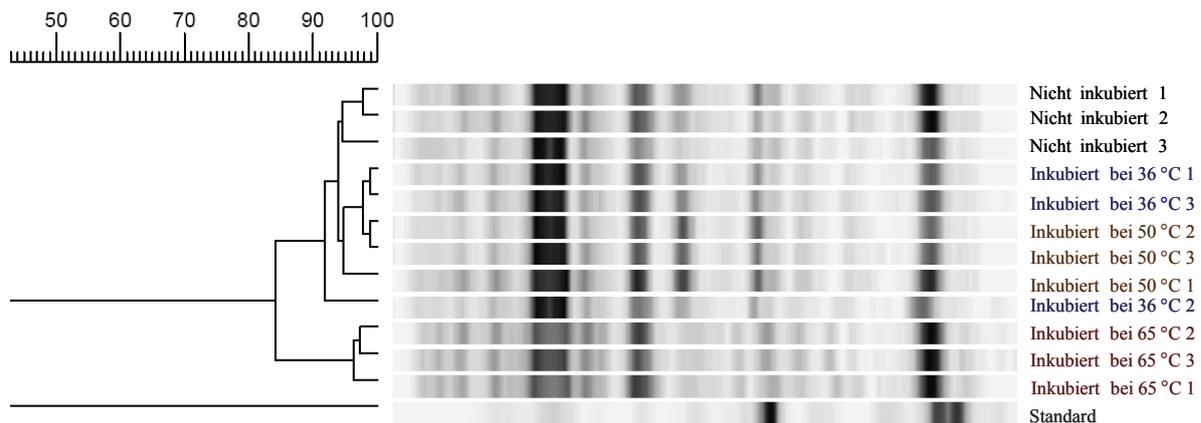


Abbildung 16

Dendrogramm des Bandenmustervergleichs (Clusteranalyse, Gel Compar II) eines normalisierten SSCP-Gels. Die Probenbezeichnung entspricht derjenigen in Abbildung 15. Die abgebildete Skala zeigt die prozentualen Unterschiede der Bandenmuster von den jeweiligen Proben zueinander. Als „Outgroup“ wurde ein Standardgemisch aus SSCP-PCR-Produkten der Reinkulturen von *Methanothermobacter thermoautotrophicus* (DSM 1053^T) und *Methanothermobacter marburgiense* (DSM 2133^T) mit eingerechnet. Als Cluster-Methode wurde der Ward Algorithmus gewählt. Ähnlichkeitsmaß: Dice Koeffizient.

3.5.2 Einfluss des pH-Wertes auf die potentielle Methanbildung im Kompostmaterial

Der Einfluss des pH-Wertes auf die potentielle Methanbildung wurde untersucht, indem jeweils sieben parallele Ansätze von 6 Wochen altem CC Kompostmaterial mit einem niedrigen Ausgangs-pH-Wert (5,2) mit 2 ml einer 10 %igen Kalkmilch versetzt und anoxisch inkubiert wurden. Weitere sieben Parallelen wurden mit anoxischem Wasser versetzt. Nach 5 tägiger anoxischer Inkubation bei 50 °C wurde sowohl die Methankonzentration in der Flaschenatmosphäre, als auch der pH-Wert im „Slurry“ gemessen. Es konnten deutliche Unterschiede in der Methanakkumulation in den unterschiedlich behandelten Proben detektiert werden. In den mit Kalkmilch behandelten Proben war der pH-Wert um eine Einheit höher und durchschnittlich war eine 20-40 fach höhere Methankonzentration in der Flaschenatmosphäre vorhanden als in den Ansätzen die mit anoxischem Wasser versetzt wurden (Abbildung 17).

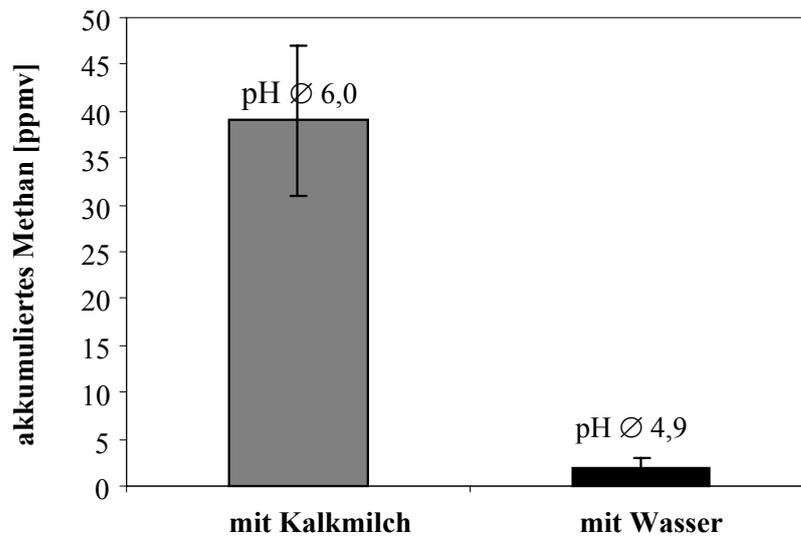


Abbildung 17

Akkumulierte Methanmenge in anoxischen Inkubationen von 6 Wochen altem CC Kompostmaterial nach 5 Tagen bei 50 °C in Abhängigkeit des pH-Wertes (gemessen im Anschluß an die Inkubation). Jeweils sieben parallele Ansätze wurden mit Kalkmilch versetzt und sieben Ansätze als Kontrollen nur mit anoxischem Wasser. Die Werte sind als Mittelwerte ($n=7$) \pm SA aufgetragen.

3.5.2.1 Organische Säuren im Kompostmaterial

Um den Gehalt an organischen Säuren im Kompostmaterial zu untersuchen, wurde 7 Wochen altes Kompostmaterial mit unterschiedlichen pH-Werten (6,8 und 5,6) mittels HPLC analysiert. In dem Material mit einem niedrigeren pH konnten die Säuren Citrat, Malonat, Succinat, Formiat, Acetat, Propionat, Butyrat und Valeriat identifiziert werden. Insgesamt wurden 200 $\mu\text{mol g-TG}^{-1}$ Kompost detektiert, wobei Formiat (121 $\mu\text{mol g-TG}^{-1}$) und Acetat (51 $\mu\text{mol g-TG}^{-1}$) den Hauptteil ausmachten.

In dem Material mit einem pH von 6,8 konnten nur Citrat, Succinat, Formiat und Acetat (1,5, 0,7, 1,1, und 0,7 $\mu\text{mol g-TG}^{-1}$) in auswertbaren Mengen detektiert werden. Insgesamt machten diese Säuren einen Wert von 4 $\mu\text{mol g-TG}^{-1}$ des Komposts aus.

In den anoxischen Inkubationen des Materials mit dem pH-Wert von 6,8 konnten nach 22 h bei 60 °C 980 ppmv Methan detektiert werden. Das Material mit dem niedrigeren pH Wert zeigte innerhalb der gleichen Inkubationszeit eine geringere Methanbildung bei 60 °C von 17 ppmv.

3.5.3 Zusatz von Acetat und Wasserstoff zu anoxischen Inkubationen von Kompostmaterial

A. Einfluss auf die Methanbildung

Für die Untersuchung des Einflusses der Substratzugabe auf die potentielle Methanbildung, wurde zu anoxischen Inkubationen von fertigem CC Kompostmaterial 15 mM Natriumacetatlösung gegeben bzw. wurde die Atmosphäre der Fläschchen mit Wasserstoffgas gespült (Fey und Conrad, 2003). Bei einer Inkubationstemperatur von 50 °C wurde die potentielle Methanbildungsrate bestimmt. Hierbei konnte ein leichter Anstieg der Methanbildungsrate nach Substratzugabe beobachtet werden (Abbildung 18). Die Methanbildungsrate stieg bei Zugabe von Wasserstoff von 0,3 auf 0,9 $\mu\text{mol g-TG}^{-1} \text{h}^{-1}$ im Vergleich zu den Proben denen kein Wasserstoff zugegeben wurde an.

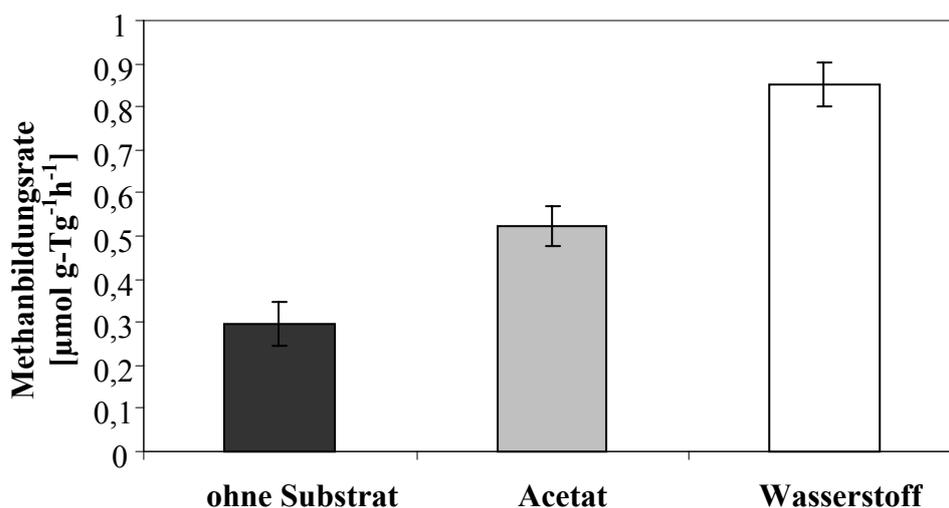


Abbildung 18

Methanbildungsrate von fertigem CC Kompostmaterial bei 50 °C während anoxischer Inkubation in Abhängigkeit des zugesetzten Substrates. Die Methanbildungsraten wurden während der Inkubation aus der linearen Zunahme der Methankonzentrationen in der Flächenatmosphäre bestimmt. Die Werte sind als Mittelwerte ($n=3$) \pm SA aufgetragen.

B. Einfluss auf die *Archaea* Population

Um zu untersuchen, ob die im Kompostmaterial vorhandene *Archaea* Gemeinschaft durch die Substratzugabe beeinflusst werden, wurde nach 10 tägiger Inkubation der oben beschriebenen Kompostproben eine spezifische PCR-SSCP-Analyse durchgeführt (Abbildung 19). Durch Anwendung dieser Methode konnten nach einer Clusteranalyse Unterschiede in der *Archaea* Population zwischen den Inkubationen festgestellt werden (Abbildung 20). Die drei parallelen Ansätze denen Wasserstoff als Substrat zugesetzt

wurde, fielen in eine gemeinsame Gruppe und konnten so deutlich von den Inkubationen mit Acetat und dem Ansatz ohne Substrat getrennt werden.

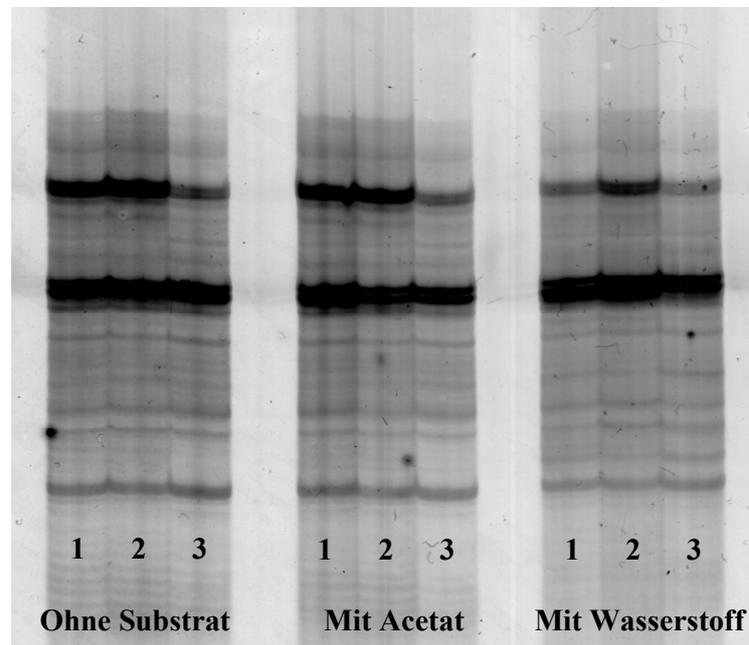


Abbildung 19

SSCP-Gel nach elektrophoretischer Auftrennung der aus fertigem CC Kompost mit den Primern A112f und x036r-PH generierten SSCP-PCR-Produkte. Zuvor wurden die CC Kompostproben mit unterschiedlichen Substraten für 10 Tage bei 50 °C anoxisch inkubiert und die DNA anschließend extrahiert. 1-3: Aufgetragen wurden SSCP-PCR-Produkte die aus DNA der drei parallel inkubierten Proben generiert wurden.

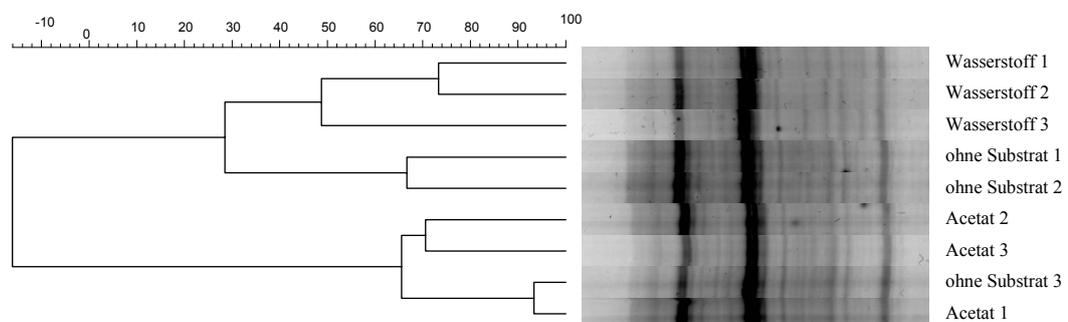


Abbildung 20

Dendrogramm des Bandenmustervergleichs (Clusteranalyse, GelCompar II) eines normalisierten SSCP-Gels (Abbildung 19, PCR-Produkte generiert mit den Primern A112f und x036r-PH). Die DNA wurde direkt aus dem mit unterschiedlichen Substraten für 10 Tage anoxisch bei 50 °C inkubiertem reifen CC Kompost extrahiert und als „Template“ in die PCR-SSCP eingesetzt. Die Beschriftungen 1-3 bezeichnen jeweils drei unabhängige Inkubationen bzw. DNA-Extraktionen, die für jedes Material durchgeführt wurden. Die abgebildete Skala zeigt die prozentualen Unterschiede der Bandenmuster der jeweiligen Proben zueinander. Als Clustermethode wurde der Ward Algorithmus verwendet. Ähnlichkeitsmaß: Dice-Koeffizient.

3.5.4 Einfluss der Sauerstoffkonzentration

Der Einfluss von Sauerstoff auf die Methanogenese wurde analysiert, indem anoxische Inkubationen von reifem CC Kompostmaterial so lange bei 50 °C inkubiert wurden, bis die

Methankonzentrationen in den Flaschenatmosphären linear anstieg. Zu diesem Zeitpunkt (nach ca. 29 h) wurden unterschiedliche Sauerstoffmengen in die Flaschenatmosphäre injiziert, so dass Sauerstoffkonzentrationen von 2; 6; 8,8; 20,5; 23; und 38 % in der Flaschenatmosphäre vorhanden waren.

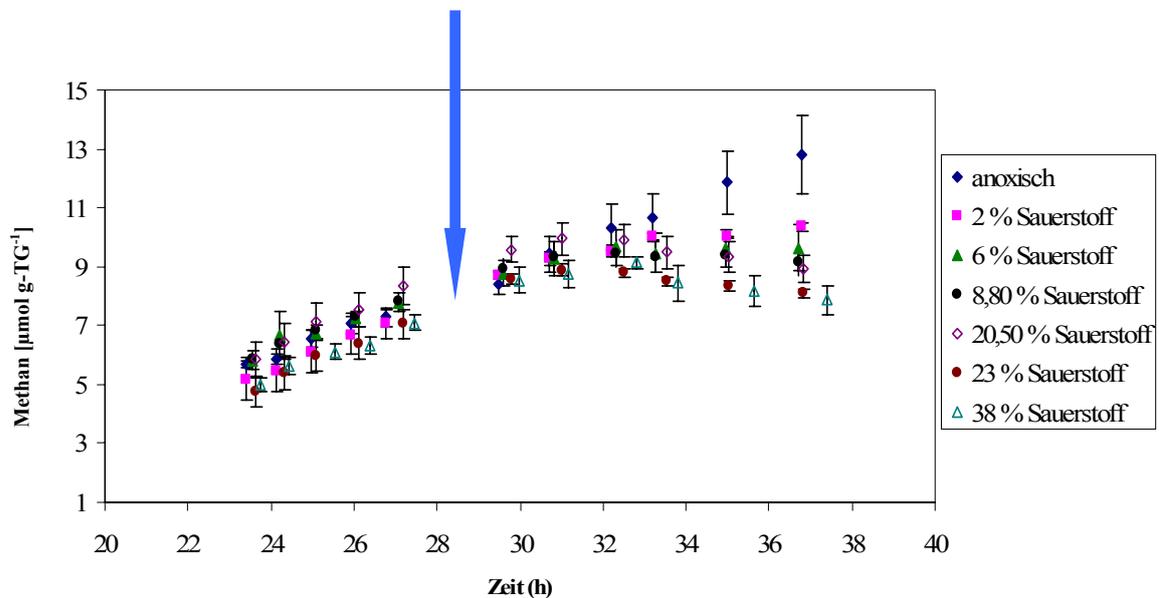


Abbildung 21

Zeitlicher Verlauf der Methankonzentrationen in anoxischen Inkubationen von fertigem CC Kompostmaterial. Der blaue Pfeil kennzeichnet die Injektion von unterschiedlichen Mengen an reinem Sauerstoff. Die Sauerstoffkonzentrationen betragen zu diesem Zeitpunkt jeweils 2,0; 6,0; 8,8; 20,5; 23,0 und 38,0 %. Die Methankonzentrationen sind als Mittelwerte ($n=3$) \pm SA aufgetragen.

Nach der Sauerstoffzugabe konnte ein deutliches Abknicken der bis dahin linear ansteigenden Methankonzentrationen beobachtet werden (Abbildung 21). In den Ansätzen in denen Sauerstoffkonzentrationen von über 8 % eingestellt wurden, nahm die Methankonzentration in der Flaschenatmosphäre wieder ab.

Der Einfluss von Sauerstoff auf die Methanogenen während des Kompostierungsprozesses konnte durch die Probennahme von Gasproben in drei Rottetunneln der NC Kompostierungsanlage untersucht werden. Trotz intensiver Belüftung (gemessene Sauerstoffkonzentration ca. 20 %) und regelmäßigem Umsetzen der Mieten konnten hier 42,6, 31,6 bzw. 142 ppmv Methan in der Tunnelatmosphäre nachgewiesen werden.

3.6 Entwicklung spezifischer Primersysteme für thermophile *Archaea*

Es wurden drei unterschiedliche Vorwärts-Primer mit Hilfe des ARB Programms neu entwickelt, die für die Detektion von drei thermophilen Spezies methanogener *Archaea* spezifisch sein sollten. Während der Optimierung der PCR Reaktion für das *Methanothermobacter thermoautotrophicus* spezifische Primersystem konnte eine Negativkontrolle (*Methanobacterium formicicum*) von der Amplifikation nicht ausgeschlossen werden.

Zur Spezifitätsüberprüfung wurden die drei Primerpaare in eine PCR Reaktion mit Kompost-DNA unterschiedlicher Proben eingesetzt. Anschließend an die darauffolgende Klonierung, wurden je Primersystem 50 *E. coli* Kolonien gepickt und es wurde über eine Reamplifikation getestet, ob das gewünschte 16S rRNA-Genfragment in das Plasmid der *E.coli* Zellen eingebaut wurde. Die PCR-Produkte der hier positiven Klone wurden in einen Verdau mit ausgewählten Restriktionsenzymen eingesetzt. Hier zeigten alle Klone das gleiche, mittels *in silico* Analyse vorhergesagte Muster. Es wurden nun pro Primersystem zufällig acht Klone ausgewählt, deren Plasmide extrahiert wurden, um anschließend eine Sequenzierung durchzuführen.

Die Auswertung der Sequenzen ergab, dass von den Klonen des für *Methanosarcina thermophila* spezifischen Primersystems alle erhaltenen Sequenzen gleich waren und eine 99 %ige Ähnlichkeit zu der Sequenz von *Methanosarcina thermophila* (Acc.Nr. M59140) zeigten. Auch die Auswertung der Sequenzen des Primersystems für *Methanoculleus thermophilus* zeigte, dass alle acht Sequenzen gleich waren und eine 100 %ige Ähnlichkeit zur Sequenz von *Methanoculleus thermophilus* (Acc.Nr. EF118904) aufwiesen.

Im Gegensatz hierzu konnte für das Primersystem für die Spezies *Methanothermobacter thermoautotrophicus* festgestellt werden, dass fünf der acht Sequenzen eine 99 %ige Ähnlichkeit zu der ebenfalls thermophilen Spezies *Methanothermobacter wolfeii* (Acc.Nr. DQ657904) aufwiesen. Eine Sequenz zeigte 98 % Ähnlichkeit zu *Methanobacterium palustre* (Acc.Nr. DQ649333). Es wurden lediglich zwei Sequenzen mit einer 100 %igen Ähnlichkeit zu *Methanothermobacter thermoautotrophicus* (Acc.Nr. EF100758) identifiziert.

3.7 Vorkommen thermophiler methanogener *Archaea* in verschiedenen Komposten und Mist

3.7.1 SSCP-„Fingerprint“ verschiedener Kompostmaterialien mit anschließender Subklonierung

Für acht Kompostmaterialien (Tabelle 2) wurde eine vergleichende SSCP Analyse durchgeführt. Hierfür wurden für jede Probe zwei voneinander unabhängige DNA-Extraktionen durchgeführt, sodass zwei SSCP-Muster pro Kompostmaterial generiert wurden (Abbildung 22). Die parallel erzeugten SSCP-Profile der gleichen Probe waren jeweils sehr ähnlich, so dass davon ausgegangen werden konnte, dass DNA Extraktion und PCR Amplifikation gut reproduzierbar waren.

Der Vergleich der SSCP-Muster die aus unterschiedlichen Komposten generiert wurden, zeigte zum einen Banden die aus allen Proben generiert wurden, und andererseits Banden, die spezifisch für einige Materialien waren (Abbildung 22). Um die, für die dominanten Banden im SSCP-Profil des CC Kompostmaterials verantwortlichen Spezies, zu erfassen, wurden die DNA-Banden aus dem Gel ausgeschnitten (siehe Kennzeichnung Abbildung 22), reamplifiziert und über das Anlegen einer Klonbibliothek und anschließender Sequenzierung näher analysiert. Tabelle 10 zeigt den ermittelten nächsten Verwandten der aus den Klonkolonien isolierten Plasmidinserts. Nach der Sequenzierung wurde deutlich, dass in drei Banden (b, c, e) jeweils zwei unterschiedliche Sequenztypen vorhanden waren. In den beiden anderen Banden (a und d) konnte jeweils nur ein Sequenztyp festgestellt werden. Die Sequenz unter der Bande *d* zeigte die höchste Ähnlichkeit zum 16S rRNA-Gen der mesophilen Spezies *Methanosarcina barkeri*. Die in den Banden *a* und *e* nachgewiesenen 16S rRNA-Genabschnitte hatten die höchste Ähnlichkeit zum 16S rRNA-Gen aus *Methanosarcina thermophila*. Die Bande *d* konnte der mesophilen Spezies *Methanosarcina barkeri* zugeordnet werden. Banden *a* und *e* wurden vermutlich von einzelsträngiger DNA der thermophilen, acetogenen Spezies *Methanosarcina thermophila* repräsentiert. Die Bande *a* war deutlich in jedem der acht Materialien zu identifizieren, genauso wie die Bande *b*, die *Methanoculleus thermophilus* bzw. *Methanobacterium formicium* zugeordnet wurde. Diese Zuordnung der Banden *a* und *b* wurde ebenfalls über die Standard-„Fingerprints“ der Reinkulturen bestätigt. Die einzelsträngige DNA der Reinkulturen von *Methanosarcina thermophila* und *Methanoculleus thermophilus* zeigten das gleiche Bandenmuster, wie es in den Kompostmaterialien auftrat (Abbildung 23, Profil 2 und 5).

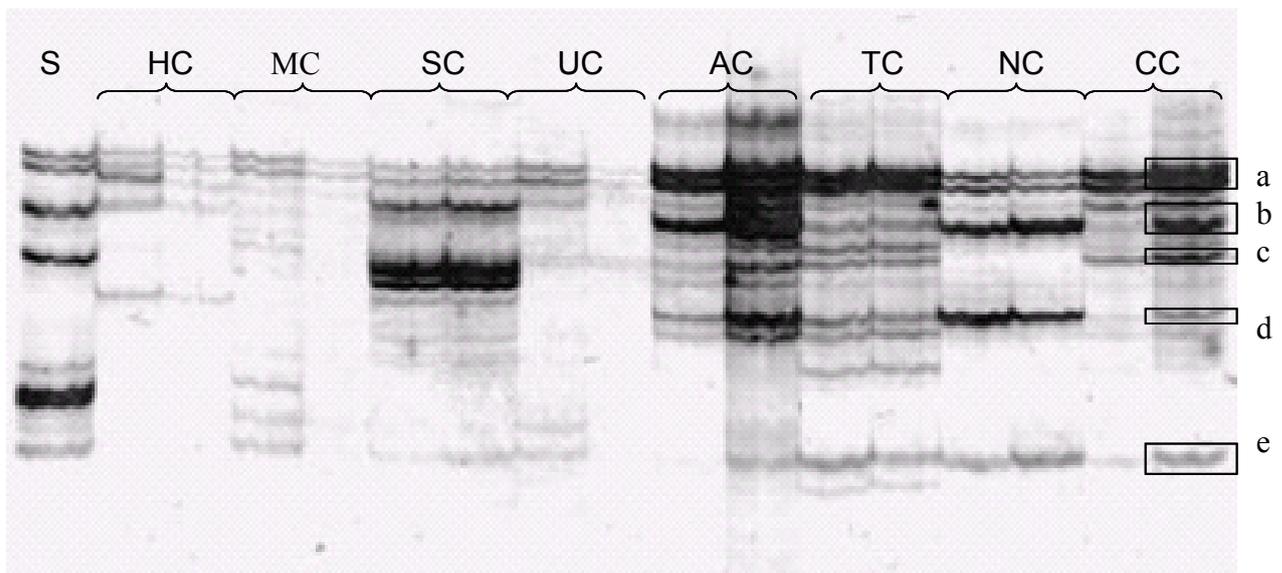


Abbildung 22

SSCP-„Fingerprint“ einzelsträngiger 16S rRNA-Gen PCR-Produkte die mit Hilfe der Primer A112f und x036r-PH generiert wurden. Die DNA wurde direkt von reifem Kompostmaterial (CC, NC, AC, HC, SC, TC, MC, UC) extrahiert und als „Template“ in die PCR-SSCP eingesetzt. S: „Fingerprint“ generiert aus einem Gemisch einzelsträngiger 16S rRNA-Genfragmente von fünf Reinkulturen (*Methanobacterium formicicum* DSM 10111, *Methanoculleus thermophilus* DSM 3915, *Methanosarcina barkeri* DSM 10131, *Methanosarcina thermophila* DSM 1825¹, *Methanothermobacter thermoautotrophicus* DSM 9446).

Tabelle 10

Zuordnung der molekularen Isolate (KT 1-10), die mittels Klonierung von Banden aus den PCR-SSCP Profilen (Bande a-e, Abbildung 22) von *Archaea* 16S rRNA-Genfragmenten gewonnen wurden. Die Amplifikation wurde mit den Primern A112f und x036r-PH mit aus reifem CC Kompost extrahierter DNA durchgeführt.

Bande	Klon (Acc.Nr.)	Nächst Verwandeter nach BLAST (Acc.Nr.)	BLAST-Ähnlichkeit (Fragmentlänge ~230 Basen)
a	KT 1 (AM747292)	<i>Methanosarcina thermophila</i> (M59140)	97 %
	KT 2 (AM747293)	<i>Methanosarcina thermophila</i> (M59140)	97 %
b	KT 3 (AM747294)	<i>Methanoculleus thermophilus</i> (EF118906)	99 %
	KT 4 (AM747295)	<i>Methanobacterium formicicum</i> (DQ649320)	96 %
c	KT 5 (AM747296)	<i>Methanosarcina thermophila</i> (M59140)	97 %
	KT 6 (AM747297)	<i>Methanoculleus thermophilus</i> (EF118906)	99 %
d	KT 7 (AM747298)	<i>Methanosarcina barkeri</i> (CP000099)	97 %
	KT 8 (AM747299)	<i>Methanosarcina barkeri</i> (CP000099)	98 %
e	KT 9 (AM747300)	<i>Methanosarcina barkeri</i> (CP000099)	97 %
	KT 10 (AM747301)	<i>Methanosarcina thermophila</i> (M59140)	98 %

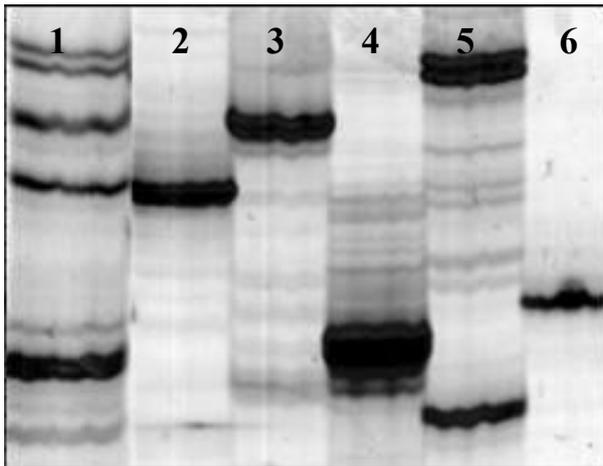


Abbildung 23

SSCP-„Fingerprint“ einzelsträngiger 16S rRNA-Gen PCR-Produkte die mit Hilfe der Primer A112f und x036r PH generiert wurden. 1 μ l der flüssigen Reinkultur wurde direkt in die PCR eingesetzt. 1: Standardgemisch, 2: *Methanobacterium formicicum* DSM 10111, 3: *Methanoculleus thermophilus* DSM 3915, 4: *Methanosarcina barkeri* DSM 10131, 5: *Methanosarcina thermophila* DSM 1825^T, 6: *Methanothermobacter thermoautotrophicus* DSM 9446.

3.7.1.1 Clusteranalyse der SSCP-Bandenmuster verschiedener Komposte

Um die SSCP-Bandenmuster der verschiedenen Kompostmaterialien untereinander zu vergleichen, wurde eine Clusteranalyse mit dem GelCompar Programm durchgeführt. In dem Dendrogramm (Abbildung 24) wurde eine klare Abspaltung der Grünschnitt-Komposte (HC, UC, MC, SC) von den Biomüll- bzw. gemischten (Grünschnitt und Biomüll) Komposten deutlich (TC, CC; NC; AC). Reiner Biomüllkompost (TC, AC) ließ sich durch diese Berechnung nicht von Komposten mit gemischten Rotteausgangsmaterialien trennen (CC, NC). Außer den beiden Parallelen des UK (a und b) Materials fielen alle Bandenmuster der Kompostparallelen in ein eigenes Cluster.

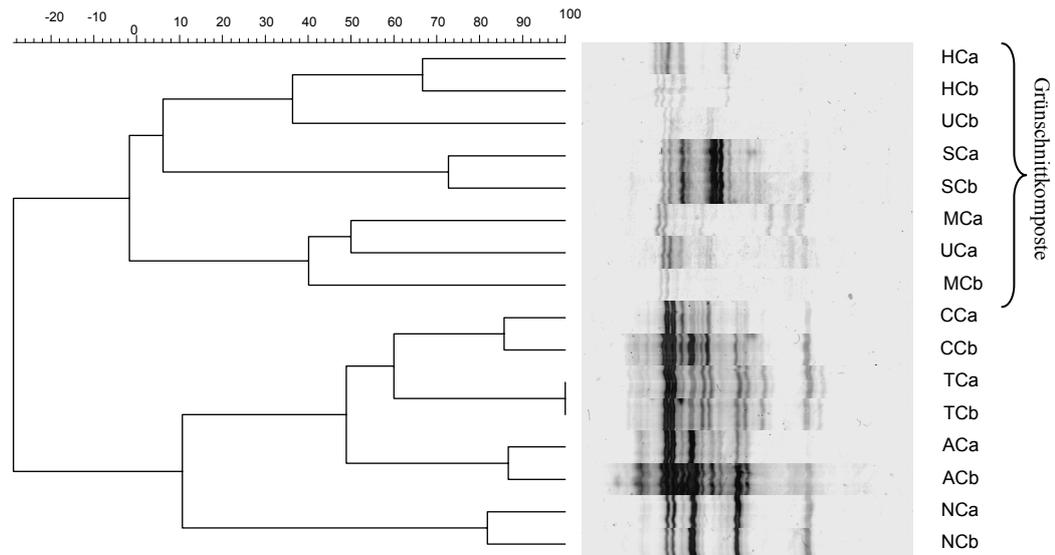


Abbildung 24

Dendrogramm des Bandenmustervergleichs (Clusteranalyse, GelCompar II) eines normalisierten SSCP-Gels (PCR-Produkte generiert mit den Primern A112f und x036r-PH). Die DNA wurde direkt aus reifem Kompostmaterial (CC, NC, AC, HC, SC, TC, MC, UC) extrahiert und als „Template“ in die PCR-SSCP eingesetzt. Die Beschriftungen a und b bezeichnen jeweils zwei unabhängige DNA-Extraktionen, die für jedes Material durchgeführt wurden. Die abgebildete Skala zeigt die prozentualen Unterschiede der Bandenmuster der jeweiligen Proben zueinander. Als Clustermethode wurde der Ward Algorithmus verwendet. Ähnlichkeitsmaß: Dice Koeffizient.

3.7.2 SSCP-„Fingerprint“ unterschiedlicher organischer Materialien

Es wurde ein SSCP-„Fingerprint“ von mit CC Kompost gedüngtem Ackerboden (AK), dem Kontrollboden A sowie PA, PC und PS angefertigt. In der Probe AK und A sowie in denen der gerotteten Materialien ließ sich die dominante Bande von *Methanosarcina thermophila* erkennen, außer in dem nicht gerotteten frischen Material des Pferdeapfels. Das Muster dieser Probe unterscheidet sich deutlich von dem aller anderen Proben (Abbildung 25).

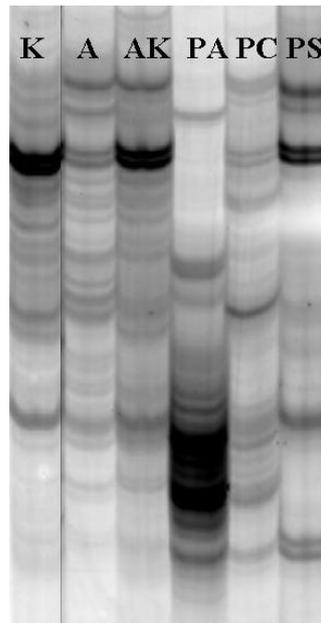


Abbildung 25

SSCP-„Fingerprint“ einzelsträngiger 16S rRNA-Gen PCR-Produkte generiert mit den Primern A112f und x036r PH. K: reifer CC Kompost, A: Ackerboden ohne Kompostdüngung, AK: Ackerboden mit CC Kompost gedüngt, PA: frischer Pferdeapfel, PC: Pferdemist-Kompost, PS: durchgerotteter Pferdemist.

3.7.3 Nachweis von *Ms. thermophila*, *Mc. thermophilus* und *Methanothermobacter sp.* in verschiedenen Komposten und Mist mittels PCR

Um die drei thermophilen methanogenen Spezies *Methanosarcina thermophila*, *Methanoculleus thermophilus* und *Methanothermobacter thermoautotrophicus* in den reifen Komposten und anderen organischen Materialien nachzuweisen, wurden die DNA-Extrakte der Proben in PCR-Ansätze mit allen drei entwickelten Primersystemen (Abschnitt 2.7.2.3, Tabelle 5) eingesetzt. Mit den in dieser Arbeit optimierten Bedingungen führten die PCR-Reaktionen, trotz detektierter methanogener Aktivität bei höheren Temperaturen (Tabelle 9), nicht bei allen Proben zu einer positiven Amplifikation. In den Proben der Grünschnittkomposte (HC, MC, UC, SC), des Gartenkomposts (GC) und des Pferdemistkomposts (PC) konnte mittels spezifischer PCR keine der drei Spezies nachgewiesen werden (Tabelle 11). Die Komposte CC, AC und der durchgerottete Pferdemist PS waren die einzigen Materialien, in denen alle drei Spezies mittels PCR nachgewiesen werden konnten.

Um auszuschließen, dass eine fehlende DNA-Bande im Agarosegel auf eine Hemmung der PCR durch Hemmstoffe in den DNA-Extrakten zurückzuführen war, wurden den PCR Ansätzen Reinkulturen der drei thermophilen Spezies zugesetzt. Bei allen Ansätzen war anschließend an die PCR und gelelektrophoretische Auftrennung der DNA eine deutliche

Bande im Agarosegel sichtbar. Somit konnten Hemmeinflüsse auf die Amplifikation ausgeschlossen werden.

Tabelle 11

Ergebnisse der spezifischen Amplifikation mit den in dieser Arbeit entwickelten Primersystemen spezifisch für *Ms. thermophila*, *Mc. thermophilus* und *Mtb. thermoautotrophicus*. In die PCR-Reaktion wurden die, aus den unterschiedlichen Kompostmaterialien, extrahierte DNA eingesetzt. +: Deutlich sichtbare DNA-Bande im Agarosegel nach Elektrophorese. -: Keine DNA-Bande im Agarosegel sichtbar.

Probe	Amplifikation der 16S rRNA-Gene von		
	<i>Ms. thermophila</i>	<i>Mc. thermophilus</i>	<i>Mtb. thermoautotrophicus</i> .
CC	+	+	+
NC	+	+	-
TC	-	-	+
AC	+	+	+
HC	-	-	-
MC	-	-	-
UC	-	-	-
SC	-	-	-
PC	-	-	-
GC	-	-	-
PS	+	+	+
PA	-	-	-

3.8 Untersuchung von Bioaerosolen der CC Kompostierungsanlage- Verbreitung methanogener *Archaea* über die Luft

Um zu untersuchen, ob während des Umsetzens der Kompostmieten methanogene *Archaea* in die Luft freigesetzt werden, wurden vier Gelatinefilter während des Umsetzvorganges auf der Kompostierungsanlage mit Bioaerosolen beaufschlagt und im Labor anoxisch in *Methanosarcina thermophila* spezifischem Medium inkubiert. In allen Inkubationen konnte eine deutliche Zunahme der Methankonzentration über die Inkubationszeit beobachtet werden. Nach fünf Tagen wurden Methanmischungsverhältnisse zwischen 28000 und 35000 ppmv in der Flaschenatmosphäre detektiert (Abbildung 26A). Die molekulare Analyse dieser Flüssigkulturen nach 20 Tagen Inkubation mit den spezifischen Primern (Tabelle 5) ergab eine positive Amplifikation für *Methanosarcina thermophila* und *Methanoculleus thermophilus*. *Methanothermobacteriaceae* konnten nicht nachgewiesen werden. Mit dem *Methanosarcina thermophila* spezifischen Primersystem

wurde zusätzlich eine Realtime-PCR mit DNA-Extrakten der drei gesammelten Bioaerosolproben durchgeführt. Pro Filter wurde ein Ansatz von Tag 1 der anoxischen Inkubation und ein Ansatz von Tag 20 der Inkubation angefertigt. Für alle Bioaerosolproben konnte eine deutliche Zunahme der Anzahl an *Methanosarcina thermophila* spezifischen „Templates“ im Laufe der anoxischen Inkubationen nachgewiesen werden (Abbildung 27).

Das SSCP-Profil einer Bioaerosolprobe, gesammelt während des Umsetzungsvorganges einer 11 Wochen alten Miete, zeigte fünf dominante Banden. Diese waren auch deutlich in dem Profil des während der Sammlung umgesetzten Kompostmaterials zu erkennen (Abbildung 26B).

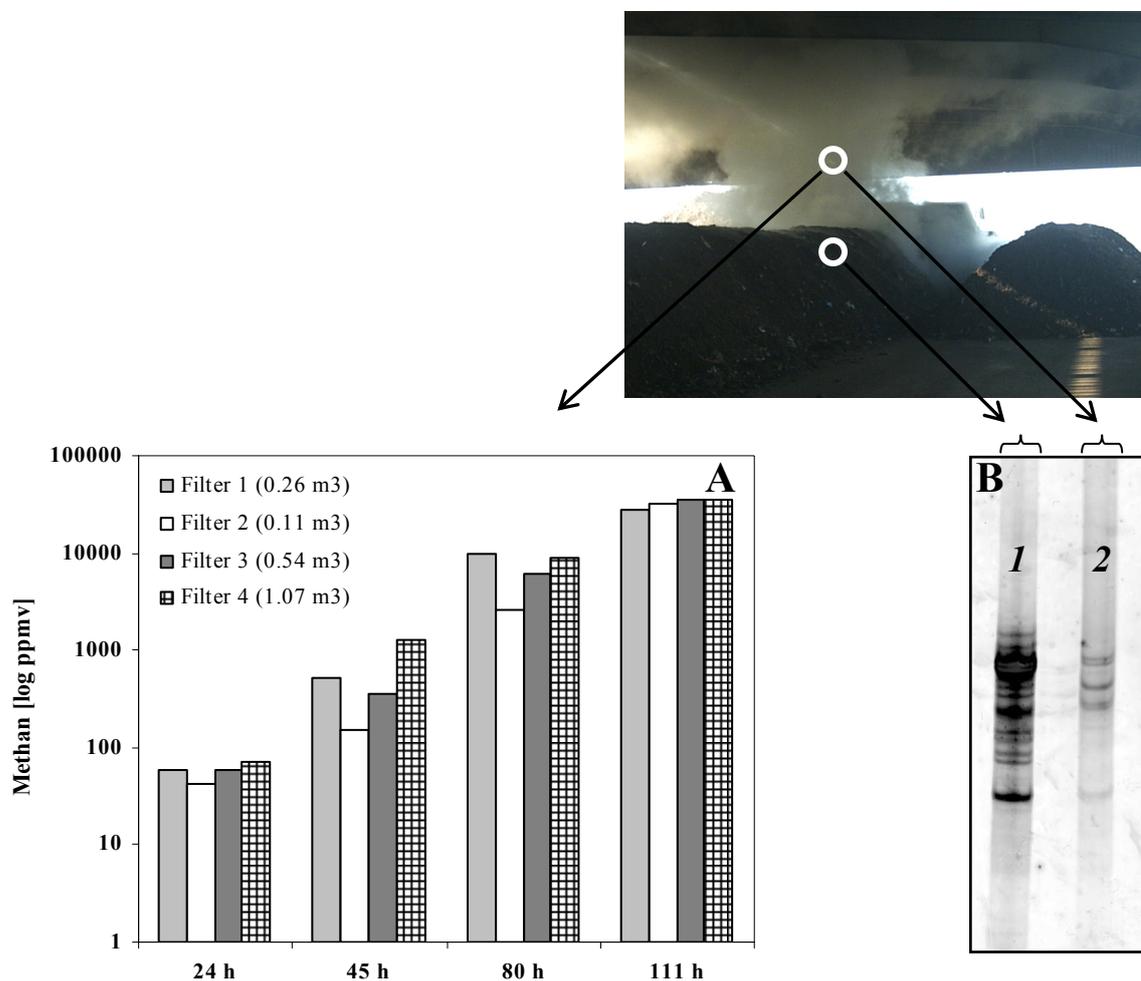


Abbildung 26

A Methankonzentration in anoxischen Inkubationen von beladenen Gelatinefiltern in *Methanosarcina thermophila* spezifischem Medium bei 50 °C. Die Bioaerosole wurden während des Umsetzungsvorganges einer 13 Wochen alten Miete (Filter 2), einer 10 Wochen alten Miete (Filter 1) und einer 4 Wochen alten Miete (Filter 3 und 4) auf der CC Kompostierungsanlage gesammelt. Die Menge an filtrierter Luft ist in der Legende in m³ angegeben. Alle Werte resultieren aus Einzelbestimmungen.

B PCR-SSCP Profil eines 11 Wochen alten CC Kompostmaterials (2) und des, während des Umsetzens dieser Miete, gesammelten Bioaerosols (1). Einzelsträngige 16S rRNA-Gen PCR-Produkte wurden mit den Primern A112f und x036r PH generiert.

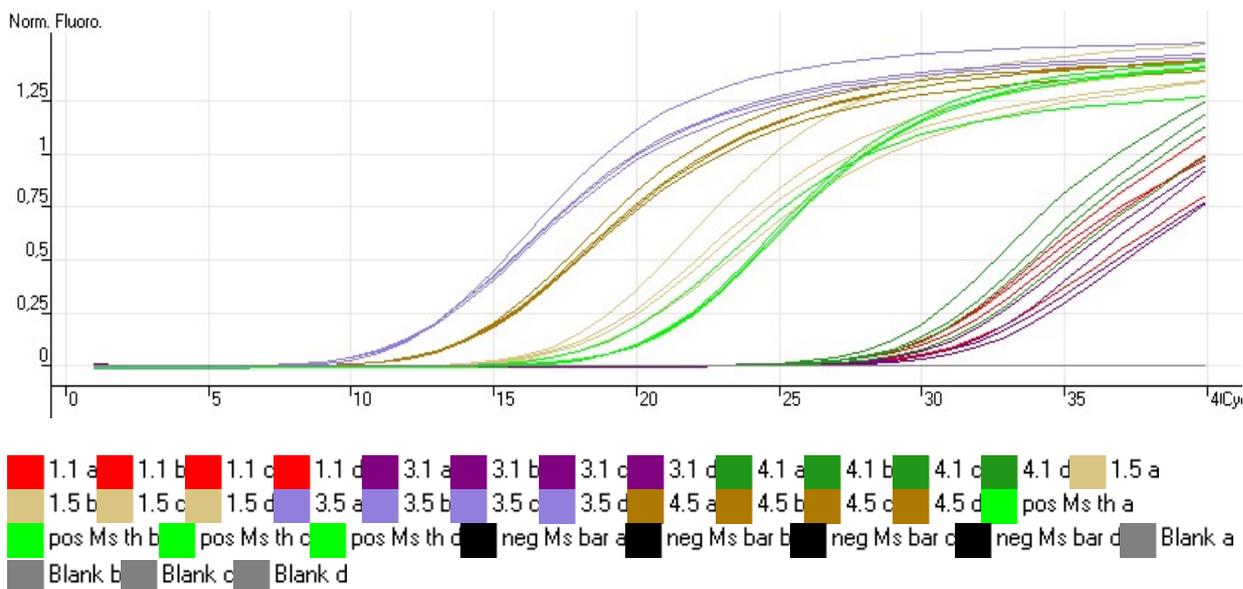
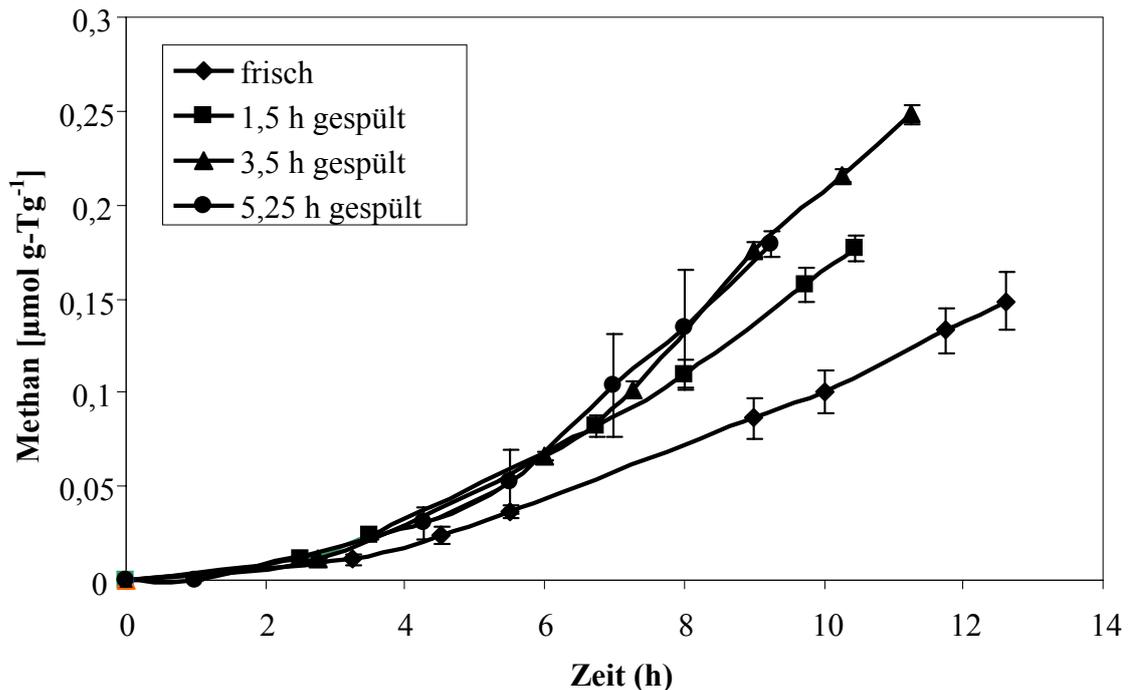


Abbildung 27

Darstellung der Fluoreszenzmessdaten der Amplifikation von DNA-Extrakten aus anoxisch, in *Methanosarcina thermophila* spezifischem Medium bei 50 °C, inkubierten Bioaerosolproben im Zyklusverlauf. Es wurden die Primer Ms628 und Ms821 verwendet. 1.1: Filter 1 an Tag 1 der Inkubation; 1.5: Filter 1 an Tag 20 der Inkubation. Entsprechend auch die Bezeichnungen der Filter 3 und 4. Je Probe wurden vier parallele Ansätze (a-d) angefertigt. Pos Ms th a-d: Positivkontrolle *Methanosarcina thermophila* Reinkultur (DSM 1825¹); neg Ms bar a-d: Negativkontrolle *Methanosarcina barkeri* Reinkultur (DSM 10131); Blank a-d: Blindwert.

3.8.1 Einfluss der Austrocknung von Kompostmaterial unter oxischen Bedingungen auf die potentielle Methanbildung

Bei einer Verbreitung methanogener *Archaea* durch Wind sind die Mikroorganismen unterschiedlichen Stressfaktoren ausgesetzt. Um die Auswirkung von Austrocknung bei gleichzeitiger Sauerstoffexposition zu simulieren, wurde reifes CC Kompostmaterial in eine Gaswaschflasche eingewogen. Für eine Dauer von 1,5, 3,5 und 5,25 h wurde Luft durch das Material geleitet, so dass es insgesamt zu einer Austrocknung des Materials von einem anfänglichen gravimetrischen Wassergehalt von 72,3 % auf 11,9 % kam. Nach anschließender anoxischer Inkubation des wieder befeuchteten Materials bei 50 °C zeigten die Proben im Vergleich zum unbehandelten Kompost ein höheres Methanbildungspotential (Abbildung 28).

**Abbildung 28**

Zeitlicher Verlauf der Methankonzentration in anoxischen Inkubationen von reifem CC Kompost bei 50 °C. Das Material wurde für unterschiedliche Zeitspannen mit Luft gespült und vor der Inkubation wieder befeuchtet. Die Konzentrationen sind als Mittelwerte ($n=3$) \pm SA aufgetragen.

So wurde in den Inkubationen des unbehandelten Komposts eine Zunahme der Methankonzentration von $15,2 \pm 1,4$ nmol CH₄ g-Tg⁻¹ h⁻¹ (berechnet zwischen Stunde 5,5 und 11 der Inkubation) detektiert, während die Raten des für 1,5 h, 3,5 h und 5,25 h getrockneten Kompostmaterials mit $25,8 \pm 1,3$, $36,6 \pm 2,2$ bzw. $28,8 \pm 1,8$ nmol CH₄ g-Tg⁻¹ h⁻¹ deutlich höher waren.

3.8.2 Einfluss von UV-Strahlung auf die potentielle Methanbildung

Um die Resistenz der Methanogen im Kompostmaterial gegen UV-Strahlung zu überprüfen, wurde reifes CC Kompostmaterial für 4 h bzw. 24 h mit UV-Licht unter oxidischen Bedingungen bestrahlt.

Nach anschließenden 26,5 h Inkubation unter anoxischen Bedingungen bei 50 °C zeigten der für 4 h und der für 24 h bestrahlte Kompost $110 \% \pm 5,9 \%$ ($2,3 \mu\text{mol CH}_4 \text{ g-TG}^{-1}$) bzw. $95 \% \pm 12,6 \%$ ($1,9 \mu\text{mol CH}_4 \text{ g-TG}^{-1}$) der Methanakkumulation des Kontroll-Komposts (für die entsprechende Zeitspanne nur getrocknet)

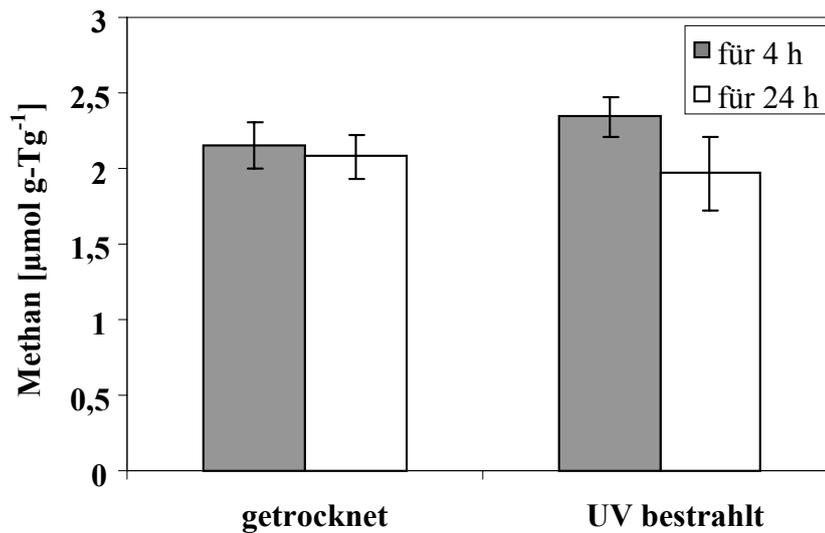


Abbildung 29

Akkumulierte Methanmenge in anoxischen Inkubationen von fertigem CC Kompostmaterial nach einer anoxischen Inkubation bei 50 °C für 26 h in Abhängigkeit von der UV-Vorbehandlung. Ein Teil des Kompostmaterials wurde unter oxischen Bedingungen mit einer Dosis von 13,7 kJ m⁻² (4 h) bzw. 82,1 kJ m⁻² (24 h) bestrahlt, während der andere Teil keiner UV-Strahlung ausgesetzt war. Die Balken entsprechen Mittelwerten von n=3 ± SA.

3.9 Kompost als Dünger – Böden der Versuchstation Linz/Österreich

3.9.1 Clusteranalyse der chemische Eigenschaften der Bodenproben aus Linz

Über eine Clusteranalyse mit der Gesamtheit an Bodenparametern (Tabelle 4), wurde eine Auftrennung der Kompostdüngervarianten deutlich, mit Ausnahme der OWC und GIC Varianten, die einander nicht eindeutig zugeordnet wurden (Abbildung 30).

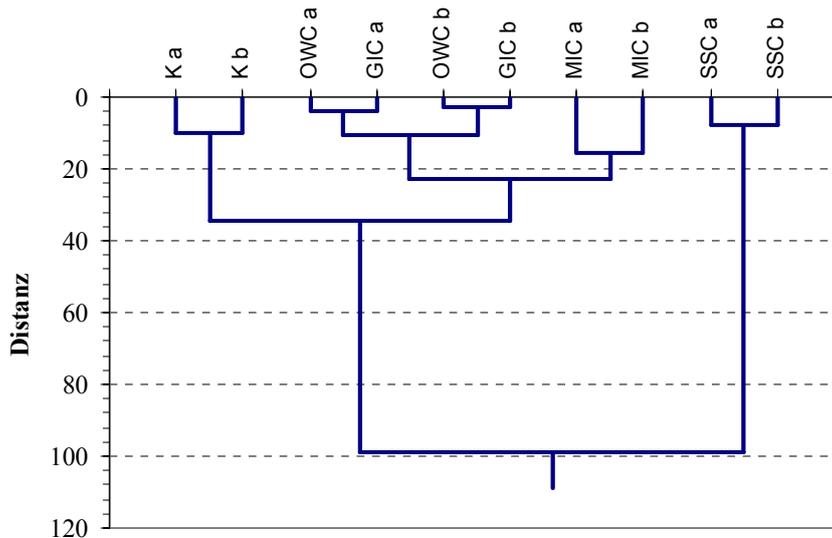


Abbildung 30

Dendrogramm der Clusteranalyse der Bodenparameter (Tabelle 4) der mit Kompost gedüngten Bodenproben des Langzeit Rotationsexperimentes in Linz, Österreich. K: ungedüngter Kontrollboden, OWC: Boden gedüngt mit Kompost von kommunalen Bioabfällen, GIC: Boden gedüngt mit Kompost von Grünabfällen, MIC: Boden gedüngt mit Kompost von Kuhmist und Stroheinstreu, SSC: Boden gedüngt mit Kompost von anaerob stabilisiertem Klärschlamm einer kommunalen Kläranlage in Kombination mit Baumrinde und Hackspäne als Auflockerungsbestandteile. Die Analyse fand mit der Statistik Software WinSTAT für Microsoft® EXCEL unter Verwendung des WARD Algorithmus statt.

3.9.2 Thermophile Methanbildung in mit Kompost gedüngten Böden

Um die Persistenz von methanogenen *Archaea* in mit Kompost gedüngten oxischen Böden zu untersuchen, wurde zunächst der Ackerboden AK, der regelmäßig mit reifem CC Kompost gedüngt wurde (seit ca. 5 Jahren mit 10t pro ha jährlich), auf sein potentielles Methanbildungspotential untersucht. Nach 24 h anoxischer Inkubation zeigte dieser eine deutliche Methanproduktion von 0,025 und 0,006 $\mu\text{mol Methan g-TG}^{-1} \text{ h}^{-1}$ bei 50 °C bzw. bei 60 °C. Bei 36 °C konnte eine deutlich geringere Rate von 0,002 $\mu\text{mol Methan g-TG}^{-1} \text{ h}^{-1}$ detektiert werden. Nach 10 Tagen konnte auch im Kontrollboden (mineralisch gedüngter Acker) methanogene Aktivität bei 50 °C beobachtet werden.

Eine weitere Untersuchung der Persistenz thermophiler methanogener *Archaea* aus Kompost in oxischen Böden fand anhand Bodenproben aus Linz statt. Um zu überprüfen, ob in den kompostgedüngten Böden aus Linz das Potential zur thermophilen Methanbildung vorhanden ist, wurden die unterschiedlichen Böden bei 50 °C unter anoxischen Bedingungen inkubiert. Während die Kompostdüngvarianten GIC a und b sowie die MIC a Variante die höchsten Methanbildungsraten zwischen 4,2 und 5,6 $\mu\text{mol Methan g-TG}^{-1} \text{ d}^{-1}$ zeigten, konnte für den SSC gedüngten Boden eine geringere Rate von

1,6 bzw. 1,7 $\mu\text{mol Methan g-Tg}^{-1} \text{d}^{-1}$ detektiert werden (Abbildung 31). MIC a sowie beide OWC Parallelen zeigten die geringsten Methanbildungsraten zwischen 0,5 und 1,2 $\mu\text{mol Methan g-TG}^{-1} \text{d}^{-1}$. In der Inkubation des ungedüngten Kontrollbodens konnte nur sehr wenig Methan detektiert werden, dessen Konzentration sich in den letzten Stunden der Inkubation nicht mehr änderte.

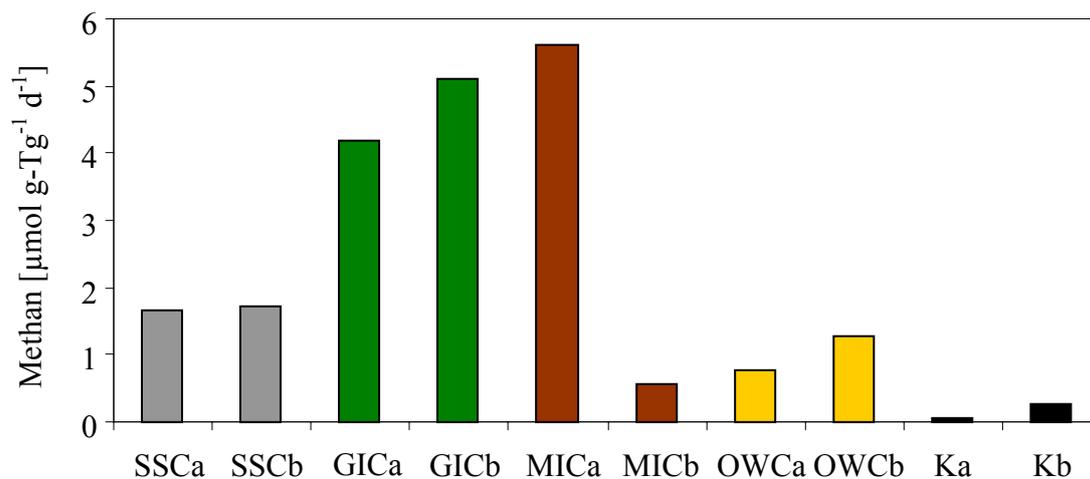


Abbildung 31

Methanbildungsraten von mit unterschiedlichen Komposten gedüngten Böden während anoxischer Inkubation bei 50 °C. Die Beschriftung a und b bezeichnet die parallelen Parzellen der jeweiligen Kompostdüngewariante. Raten resultieren aus Einzelbestimmungen.

3.9.3 Detektion thermophiler methanogener Archaea mittels SSCP und PCR

Über eine Clusteranalyse des mit den 16S rRNA-Gen PCR-Produkten der DNA-Extrakte der für 20 Tage inkubierten Linzer Proben angefertigten SSCP-Gels konnte festgestellt werden, dass die Proben entsprechend der Höhe ihrer Methanbildungsrate (Abschnitt 3.9.2) unterschiedliche Cluster bildeten (Abbildung 32). Die Böden mit der höchsten Methanbildungsrate bildeten eine Gruppe, wobei die Kompostdüngewariante SSC a und b, die im mittleren Bereich der Methanbildungsrate lagen, einen eigenen Abzweig innerhalb dieses Clusters bildeten.

Weiterhin waren die Unterschiede in Methanbildungsrate und SSCP-Profil der beiden MIC Parallelen sehr deutlich. Sie fielen in unterschiedliche Cluster. Alle Parallelen der anderen Kompostdüngewarianten ließen sich mit Hilfe der Clusteranalyse einander zuordnen. Aus dem DNA-Extrakt des Kontrollbodens K konnte nach Amplifikation mit dem eingesetzten

Archaea spezifischen Primersystem kein PCR-Produkt gewonnen werden, somit konnte keine PCR-SSCP mit dem Kontrollboden durchgeführt werden.

Die drei thermophilen Spezies *Ms. thermophila*, *Mc. thermophilus* und *Methanothermobacter* sp. waren mittels PCR mit den spezifischen Primern weder in den frischen Bodenproben noch in den bei 50 °C für 20 Tage anoxisch inkubierten Proben nachzuweisen.

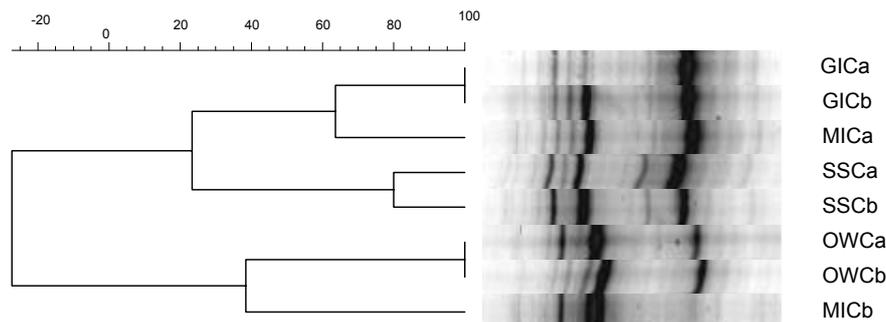


Abbildung 32

Dendrogramm des Bandenmustervergleichs eines normalisierten SSCP-Gels (PCR-Produkte generiert mit den Primern A112f und x036r-PH). Die DNA wurde direkt aus den für 20 Tage anoxisch inkubierten mit Kompost gedüngten Böden (GIC, MIC, SSC, OWC) extrahiert und als „Template“ in die PCR-SSCP eingesetzt. Die abgebildete Skala zeigt die prozentualen Unterschiede der Bandenmuster der jeweiligen Proben zueinander. Als Clustermethode wurde der Ward Algorithmus verwendet. Ähnlichkeitsmaß: Dice Koeffizient.

3.10 Vorkommen thermophiler methanogener *Archaea* in oxischen Böden

3.10.1 *Thermophiles Methanbildungspotential und chemische Eigenschaften der Acker- und Grünlandböden*

Um das Vorkommen thermophiler methanogener *Archaea* in moderaten, oxischen Böden zu untersuchen, wurden innerhalb Deutschlands 29 unterschiedliche Böden beprobt (Tabelle 3, Abbildung 4) und auf thermophile Methanbildung untersucht. Zusätzlich wurden die Bodenparameter pH-Wert, gravimetrischer Wassergehalt, maximale Wasserhaltekapazität, Kohlenstoff-, Stickstoff-, sowie Schwefelgehalt, C/N Verhältnis, löslicher Kohlenstoff bestimmt. Am Ende jeder anoxischen Inkubation wurden außerdem die im Wasser gelösten kurzkettigen Fettsäuren ermittelt.

Mit Hilfe von Clusteranalysen, basierend auf den Bodenparametern (Tabelle 12), konnte keine eindeutige Auftrennung der Acker- und der Grünlandböden festgestellt werden.

Das geringste C/N Verhältnis wies mit 5,9 der Ackerboden B1 auf. Das höchste konnte im Wiesenboden H1 mit 23,6 detektiert werden. Der Moorboden H5 wies eine chemische Zusammensetzung auf, die sich deutlich von der der anderen Böden unterschied. Mit 258 µg wasserlöslichem Kohlenstoff pro g-TG konnte hier die höchste Menge detektiert werden. Auch die Werte für den gravimetrischen Wassergehalt GW, sowie den Kohlenstoff-, Stickstoff- und Schwefelgehalt in % waren im Vergleich zu den anderen Böden im Moorboden erhöht. Der pH-Wert war mit 3,0 der niedrigste von allen untersuchten Bodenproben (Tabelle 12).

Von den 29 untersuchten Böden, konnte in 25 Bodeninkubationen die Bildung von Methan (> 1000 ppmv innerhalb von einem Monat) bei 50 °C festgestellt werden. Am schnellsten (nach 4 Tagen) setzte die Methanbildung bei der Inkubation des Grünlandbodens B4 ein. Mit 18 Tagen dauerte das Einsetzen der Methanbildung im Grünlandboden B5 am längsten. Neun der Bodeninkubationen, in denen ein deutlicher Anstieg der Methankonzentration bei 50 °C erfasst wurde, zeigten eine Zunahme der Methanmenge in der Flaschenatmosphäre auch bei 25 °C (> 100 ppmv Methan in der Flaschenatmosphäre). Vier der 29 Böden (entsprechend 14 %) wurden als negativ in Bezug auf das Methanbildungspotential bei 50 °C gewertet (Moorboden H5, Ackerboden R1 und Grünlandboden R4 und R5). Bei 25 °C zeigten drei dieser Bodenproben hingegen eine deutliche methanogene Aktivität. Der Ackerboden R1 war der einzige Boden, der weder bei 50 °C noch bei 25 °C nach 31 tägiger Inkubation eine deutliche methanogene Aktivität zeigte (Tabelle 12).

Tabelle 12

Chemische Eigenschaften und Methanbildungspotentiale bei 50°C und 25°C der Acker- und Grünlandböden von unterschiedlichen Standorten in Deutschland (Tabelle 3, Abbildung 4). Die anoxischen Inkubationen, in deren Flaschenatmosphäre nach einem Monat keine 1000 ppmv Methan nachzuweisen waren, wurden als negativ in Bezug auf thermophile Methanbildung gewertet. In den anderen Ansätzen wurde die Inkubation mit Erreichen von 1000 ppmv Methan in der Atmosphäre abgebrochen. Die PCR wurde nach abgeschlossener Inkubation mit den DNA-Extrakten der jeweiligen Bodenprobe mit den Primern A112f/x036r durchgeführt. +: Deutlich sichtbare DNA-Bande im Agarosegel nach Elektrophorese. -: Keine DNA-Bande im Agarosegel sichtbar.

Probe	pH-Wert	GW (%)	mWHK (%)	C (%)	N (%)	C/N-Ratio	S (%)	lös l C [µg/g TG]	Methan bei 50°C	Methan bei 25°C	PCR Produkt
K1	7,2	24,22	39,2	1,283	0,101	12,71	0,012	74,83	nach 15 d 1371 ppmv	3,56 ppmv	+
K2	7,3	24,86	38,4	1,191	0,099	12,03	0,012	64,39	nach 26 d 1673 ppmv	1,1 ppmv	+
K3	5,5	23,47	29,8	0,731	0,059	12,32	0,009	51,51	nach 22 d 1822 ppmv	2 ppmv	+
B1	7,38	26	39,8	1,907	0,324	5,888	0,009	109,01	nach 10 d 1034 ppmv	2,53 ppmv	+
B2	7,18	37,9	127,7	3,666	0,296	12,38	0,032	139,78	nach 15 d 1954 ppmv	411 ppmv	+
B3	7,17	25,5	42,5	1,778	0,144	12,34	0,014	72,85	nach 10 d 919 ppmv	1,68 ppmv	+
B4	6,93	26,1	67,7	3,447	0,247	13,96	0,018	117,52	nach 8 d 1648 ppmv	2,47 ppmv	+
B5	4,86	27,8	100	1,915	0,168	11,43	0,016	77,45	nach 22d 1230 ppmv	6598 ppmv	-
B6	5,47	27,3	62,3	2,499	0,211	11,86	0,016	52,01	nach 11 d 1062 ppmv	337 ppmv	+
B7	6,27	24,9	37,4	2,273	0,167	13,65	0,014	65,35	nach 10 d 1070 ppmv	220,2 ppmv	+
B8	5,75	23,9	33,1	1,177	0,096	12,29	0,012	42,43	nach 16d 1309 ppmv	2,1 ppmv	+
B9	5,25	24,9	56,9	2,327	0,18	12,92	0,015	47,43	nach 10 d 1000 ppmv	4,97 ppmv	+
B10	6,29	21	37,8	2,421	0,137	17,62	0,019	63,86	nach 8 d 1865 ppmv	39,45 ppmv	+
H1	4,5	46,3	116,2	9,05	0,383	23,63	0,059	106,04	nach 15 d 2432 ppmv	118 ppmv	+
H2	4,61	26,2	40,3	2,705	0,138	19,66	0,016	83,35	nach 15 d 3111 ppmv	1575 ppmv	+
H3	5,91	26,8	28,4	1,949	0,108	17,97	0,017	38,01	nach 17 d 1525 ppmv	2548 ppmv	+
H4	4,81	19,4	56,4	2,851	0,132	21,62	0,017	48,20	nach 15 d 1992 ppmv	227 ppmv	-
H5	3,04	170,1	57,4	18,53	0,49	37,8	0,076	258,19	nach 31 d 5 ppmv	1972 ppmv	-
R1	6,18	28,7	59,1	2,012	0,172	11,73	0,02	65,16	nach 31 d 469 ppmv	20 ppmv	+
R2	6,08	29,7	46	2,472	0,203	12,17	0,021	65,51	nach 8 d 1149 ppmv	5,6 ppmv	+
R3	5,85	31,7	47,8	6,675	0,288	23,22	0,022	173,09	nach 29 d 1017 ppmv	717 ppmv	-
R4	4,83	31	81,2	2,48	0,203	12,24	0,024	85,14	nach 29 d 11 ppmv	1722 ppmv	-
R5	5,18	26,1	56,4	3,231	0,26	12,44	0,026	84,71	nach 29 d 11 ppmv	3394 ppmv	-
M1	7,61	35,8	47,4	4,319	0,219	19,71	0,026	106,84	nach 7 d 1836 ppmv	5,7 ppmv	+
M2	5,48	26	42,5	1,344	0,108	12,45	0,019	53,18	nach 15 d 1207 ppmv	1,4 ppmv	+
M3	5,9	31,8	54,9	1,52	0,118	12,86	0,018	81,44	nach 11 d 1000 ppmv	30 ppmv	+
D1	6,04	21,6	62,9	1,079	0,247	16,52	0,03	56,23	nach 8 d 1091 ppmv	3,8 ppmv	+
D2	6,73	21,3	66,9	3,086	0,19	16,58	0,031	70,85	nach 7 d 1876 ppmv	7,6 ppmv	+
D3	5,59	23,7	59,1	2,524	0,16	15,77	0,025	48,83	nach 11 d 2154 ppmv	20,3 ppmv	+

In der jeweiligen Inkubationsspanne (siehe Tabelle 12 Spalte „Methanbildung bei 50 °C“) konnte eine deutliche Zunahme von freien Fettsäuren in den Proben beobachtet werden. In den frischen Proben konnte kein Succinat, Propionat, Valeriat und Capronat nachgewiesen werden. Acetat war hier nur in zwei der 29 Proben nachweisbar, Butyrat konnte nur in einer Probe detektiert werden.

Tabelle 13
Konzentration an freien Fettsäuren in den frischen und anoxisch inkubierten Bodenproben unterschiedlicher Standorte in Deutschland (Tabelle 3, Abbildung 4). Die Dauer der Inkubation entsprach der, nach der auch die Methanbildung bei 50°C gemessen wurde (Tabelle 12).

Probe	Frisch					Inkubiert						
	Citrat [µM]	Malonat [µM]	Formiat [µM]	Acetat [µM]	Butyrat [µM]	Citrat [µM]	Formiat [µM]	Acetat [µM]	Propionat [µM]	Butyrat [µM]	Valeriat [µM]	Capronat [µM]
K1	13,17	0,00	231,52	0,00	0,00	18,25	114,56	9647,37	62,24	65,71	0,00	0,00
K2	0,00	0,00	124,32	0,00	0,00	6,65	40,78	7346,84	1332,65	0,00	0,00	0,00
K3	0,00	17,69	126,49	0,00	0,00	0,00	177,72	5127,12	365,38	187,22	5,61	0,00
B1	0,00	0,00	280,43	0,00	0,00	0,00	275,73	8910,00	268,37	139,50	0,00	0,00
B2	0,00	0,00	207,07	0,00	0,00	7,21	751,46	18720,00	1687,76	281,69	32,83	0,00
B3	6,79	0,00	283,93	0,00	0,00	7,36	71,84	6366,32	234,69	17,24	0,00	0,00
B4	32,84	0,00	921,43	0,00	0,00	47,24	1054,37	24094,74	1770,41	590,84	163,13	0,00
B5	0,00	0,00	557,14	0,00	0,00	10,33	1759,22	19616,84	1929,59	609,69	19,19	0,00
B6	0,00	0,00	808,93	0,00	0,00	16,97	1192,23	14188,42	1122,45	540,75	45,45	0,00
B7	19,68	0,00	610,71	0,00	0,00	5,80	42,72	6898,42	169,39	57,09	0,00	0,00
B8	0,00	0,00	127,48	0,00	0,00	3,25	0,00	4624,74	423,47	35,01	0,00	0,00
B9	0,00	0,00	108,11	0,00	0,00	52,19	1087,38	14655,79	861,22	778,28	11,62	0,00
B10	33,96	176,87	140,54	77,14	0,00	3,61	555,98	8652,54	372,80	219,82	0,00	0,00
H1	0,00	0,00	132,10	0,00	0,00	0,00	302,91	17100,00	1092,86	784,74	124,75	0,00
H2	55,43	0,00	733,93	0,00	0,00	159,11	249,46	4182,20	183,00	492,51	15,84	30,80
H3	0,00	5,44	140,54	42,86	600,00	5,94	93,20	7848,95	493,88	137,88	0,00	0,00
H4	55,15	0,00	701,79	0,00	0,00	41,74	220,11	3750,00	200,93	260,35	18,48	0,00
H5	0,00	0,00	143,19	0,00	0,00	44,18	850,81	670,47	117,80	0,00	0,00	0,00
R1	0,00	0,00	131,18	0,00	0,00	0,00	128,41	1473,83	104,19	0,00	0,00	0,00
R2	0,00	0,00	940,54	0,00	0,00	5,37	19,42	4458,95	269,39	71,63	0,00	0,00
R3	0,00	0,00	669,64	0,00	0,00	0,00	348,27	6288,59	684,82	246,36	0,00	259,02
R4	6,79	0,00	358,93	0,00	0,00	0,00	181,99	3985,23	550,26	160,37	0,00	126,02
R5	0,00	29,93	140,54	0,00	0,00	0,00	584,76	2319,46	502,09	218,69	0,00	174,90
M1	0,00	0,00	220,11	0,00	0,00	20,61	24,46	6812,71	803,09	188,11	0,00	0,00
M2	6,51	0,00	744,64	0,00	0,00	0,00	122,16	3437,14	250,00	74,42	0,00	33,33
M3	11,36	0,00	867,86	0,00	0,00	0,00	322,16	5760,00	475,00	172,09	20,18	41,00
D1	3,60	0,00	744,64	0,00	0,00	0,00	11,40	938,20	99,40	92,10	11,10	0,00
D2	7,81	0,00	102,70	0,00	0,00	28,64	0,00	8735,14	490,00	212,09	0,00	0,00
D3	12,33	0,00	498,21	0,00	0,00	0,00	1113,51	6137,14	465,63	227,91	28,99	67,00

Formiat war die einzige Säure, die in allen frischen Proben nachgewiesen werden konnte. Nach der anoxischen Inkubation stieg der Gehalt an freien Fettsäuren deutlich an. Von den im Standard enthaltenen Fettsäuren waren Malonat und Succinat die einzigen, die in keiner der inkubierten Proben nachgewiesen werden konnten. Die Acetatgehalte stiegen während der Inkubation bis zu 24000 μM (Wiesenboden B4) an (Tabelle 13).

3.10.2 Detektion thermophiler methanogener Archaea mittels SSCP und PCR in oxischen Böden

Mit den drei spezifischen Primersystemen für thermophile *Archaea* (Tabelle 5) konnte aus keiner der analysierten Bodenproben PCR-Produkte erhalten werden.

Die Durchführung der PCR mit den *Archaea* spezifischen Primern A112f/x036r führte unter den angegebenen Bedingungen (Tabelle 6) nur bei den DNA Extrakten der anoxisch inkubierten Proben zu einer Amplifikation.

Nach anschließender Generierung von SSCP-„Fingerprintmustern“, konnte mit Hilfe der Clusteranalyse keine Auftrennung der inkubierten Böden in Bezug auf Bodenart, chemische Eigenschaften oder Standort im Zusammenhang mit den *Archaea* spezifischen „Fingerprints“ erzielt werden. Die Clusteranalyse zeigt jedoch eine Auftrennung der „Fingerprints“ in zwei große Cluster (Abbildung 33).

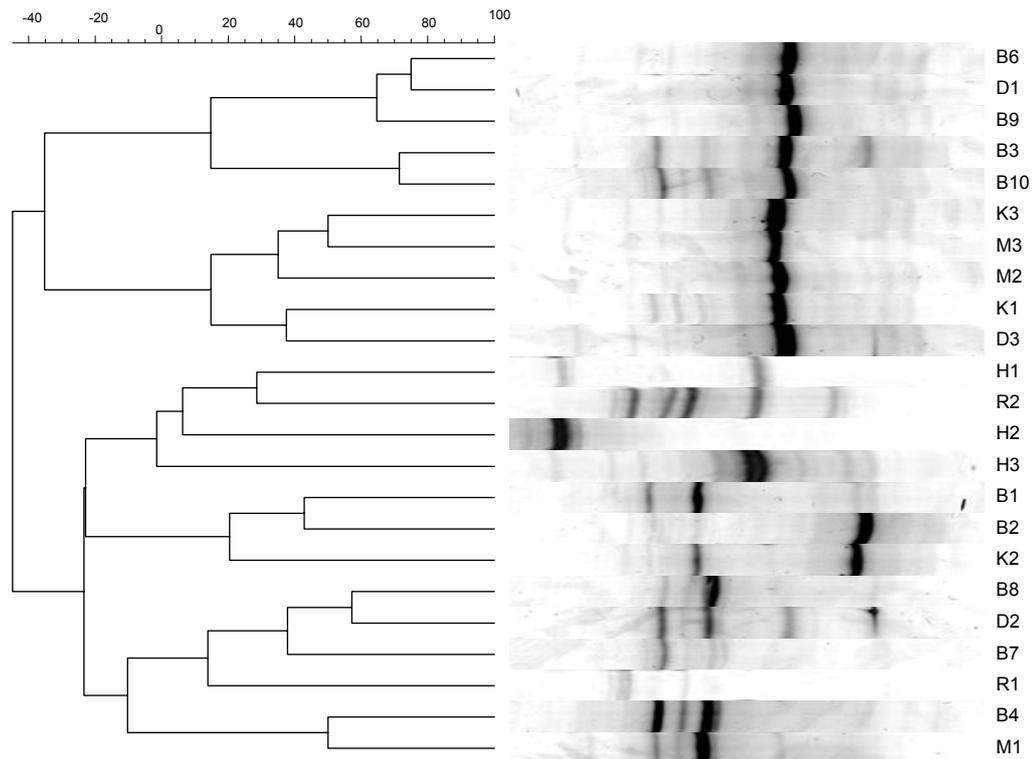


Abbildung 33

Dendrogramm des Bandenmustervergleichs eines normalisierten SSCP-Gels (PCR-Produkte generiert mit den Primern A112f und x036r-PH). Die DNA wurde direkt aus den anoxisch inkubierten Böden von unterschiedlichen Standorten in Deutschland (Tabelle 3) extrahiert und als „Template“ in die PCR-SSCP eingesetzt. Die Dauer der Inkubation entsprach der, nach der auch die Methanbildung bei 50 °C gemessen wurde (Tabelle 12). Die abgebildete Skala zeigt die prozentualen Unterschiede der Bandenmuster der jeweiligen Proben zueinander. Als Clustermethode wurde der Ward Algorithmus verwendet. Ähnlichkeitsmaß: Dice Koeffizient.

4 Diskussion

4.1 Methanbildung im Kompostmaterial

Es gibt vergleichsweise wenige Untersuchungen dazu, ob Kompostmieten in industriellem Maßstab als Quelle für atmosphärisches Methan betrachtet werden können und es existieren bislang keine Studien, die sich im Detail mit der Methanbildung in Kompostmieten beschäftigten. Aufgrund vorliegender Erkenntnisse wurde festgestellt, dass es sich bei der Methanbildung in solchen Kompostierungsanlagen um die Aktivität thermophiler, methanbildender *Archaea* handelte. So konnten z. B. in einer Kompostmiete *in situ* Methankonzentrationen von bis zu 8×10^4 ppmv gerade dort detektiert werden, wo die Temperaturen in der Miete über 60 °C lagen (Abbildung 9A,B).

Ein Vorkommen von thermophilen Methanogenen in Kompost zeigte die gaschromatographische Messung von Methanbildungspotentialen acht unterschiedlich gereifter Komposte. Sechs Komposte zeigten ein Optimum der potentiellen Methanbildung bei 50 °C, wohingegen bei zwei Materialien die höchste Methanbildung bei 65 °C zu detektieren war (Tabelle 9). Unter Berücksichtigung der Einteilung von Organismen nach ihren Wachstumstemperaturen (Lott Fischer *et al.*, 2001) können die Beobachtungen auf die Aktivität moderat thermophiler (45 °C – 60 °C) Mikroorganismen zurückgeführt werden.

Weiterhin zeigten die Inkubationsexperimente, dass die gaschromatographisch ermittelte Methanbildung das Resultat biologischer Prozesse war. Temperaturerhöhungen bis auf 80 °C führten zu einer Verminderung der Methanbildung. Auch bei 36 °C wurde eine verminderte Methanbildung im Gegensatz zu der methanogenen Aktivität bei 50 °C und 65 °C detektiert (Tabelle 9). Eine rein chemische Methanbildung hätte einen proportionalen Anstieg der Methanbildungsrate in Abhängigkeit der Temperatur zur Folge gehabt und kann somit ausgeschlossen werden.

Unabhängig vom Kompostmaterial setzte die Methanbildung unmittelbar nach Einstellung der Inkubationsbedingungen ein (z. B. Abbildung 28). Gleichzeitig konnte mit Hilfe eines spezifischen Primersystems für *Archaea* über eine PCR aus allen Materialien ein Amplifikationsprodukt erhalten werden. Da über die Klonierung mittels des *Archaea* spezifischen Primersystems im CC Kompost überwiegend methanogene *Archaea* detektiert wurden, weisen auch diese Ergebnisse auf eine hohe Anzahl aktiver methanogener

Archaea in den untersuchten Kompostmaterialien hin. Durch zwei unabhängige Methoden zur Bestimmung der Zellanzahl konnte diese Beobachtung bestätigt werden. So wurden mittels MPN-PCR pro Gramm Trockengewicht Kompostmaterial einer 6 Wochen alten Miete von der Anlage CC 0,2 – 4×10^7 *Archaea*-Zellen ermittelt. Mit 6×10^7 Zellen pro Gramm Kompost wurden ähnliche Anzahlen durch Einbeziehung der Methanbildungsrate errechnet. Derikx *et al.* (1989) detektierten mit 2×10^8 thermophilen Methanogenen pro g-TG ähnlich hohe Zellzahlen im Champignonkompost. Unter Berücksichtigung der Ergebnisse von Ishii *et al.* (2000), der eine Gesamtzellzahl im Kompost von $10^{10} - 10^{11}$ Zellen g-TG⁻¹ detektierte, kann man somit vermuten, dass die Methanogenen mit ca. 0,01 % bis 0,1 % einen beachtlichen Anteil an der gesamten Mikroorganismengemeinschaft im Kompost ausmachen. Diese Vermutung wurde durch das Ergebnis der MPN-PCR bestärkt, da ein Verhältnis von *Archaea* zu *Bacteria* zwischen 0,004 % und 0,1 % ermittelt wurde.

Dennoch ist die Zellzahl von Methanogenen im Kompost im Vergleich zu gezielt erzeugten, anoxischen Habitaten vergleichsweise gering. Ahring (1995) ermittelte z. B. mittels MPN-Analyse bis zu 10^{11} Methanogene pro ml Schlamm in Biogasanlagen, die als Ausgangsmaterial mit Kuh- und Schweinemist sowie 15 % Industrieabfällen betrieben wurden. Ein Grund für diese Unterschiede in den Zellzahlen, muss darin gesehen werden, dass Kompost sicherlich keinen optimalen Lebensraum für methanogene *Archaea* darstellt. Aufgrund des niedrigen Wassergehaltes (\varnothing 44 % mWHK, Abschnitt 3.1) bietet er keine optimalen Bedingungen. Ergebnisse aus früheren Untersuchungen von Thummes *et al.* (2007a) unterstützen diese Vermutung, da hier eine positive Korrelation von steigendem Wassergehalt zwischen 20 und 60 % der mWHK und potentieller Methanbildung im Kompostmaterial beobachtet wurde. Im Vergleich zu den untersuchten Wassergehalten im Kompostmaterial (Tabelle 9) werden z. B. für Biogasreaktoren optimale Wassergehalte von 83 % genannt (Weiland, 2001).

Ein weiterer Grund für die niedrigen Zellzahlen Methanogener im Kompost im Vergleich zu Biogasreaktoren kann darin vermutet werden, dass durch die regelmäßig stattfindenden Umsetzungsvorgänge und Prozesseingriffe kontinuierliche anoxische Bedingungen wie in Biogasreaktoren nicht gewährleistet sind. Allerdings scheint die Exposition gegenüber Sauerstoff nicht zu einer vollständigen Unterdrückung der Methanbildung in Kompostmieten zu führen, da selbst in belüfteten Rottetunneln mit einer Sauerstoffkonzentration von 20 % in der Atmosphäre deutlich erhöhte Methankonzentrationen zu detektieren waren (bis zu 142 ppmv, Abschnitt 3.5.4).

Ausserdem wurde selbst nach intensiver oxischer Trocknung von Kompostmaterial eine rasche Reaktivierung der Methanbildung beobachtet (Abbildung 28).

Diese Beobachtung muss darauf zurückgeführt werden, dass die im Kompost vorhandenen Methanogenen Resistenzen gegenüber dem Einfluss von Sauerstoff besitzen. Fetzer *et al.* (1993) stellten fest, dass Sauerstoff keinen negativen Einfluss auf die Lebensfähigkeit von *Methanosarcina barkeri* hat, jedoch war die methanogene Aktivität im Anschluss an eine 200 minütige Inkubation einer Flüssigkultur an der Luft deutlich eingeschränkt. Leadbetter und Breznak (1996) beschreiben für *Methanobrevibacter* spp. nicht nur ein Überleben in mikrooxischen Zonen eines Termitendarms, sondern auch eine Aktivität. Auch andere Studien zeigten, dass Methanogene wie *Methanobacterium bryantii* und *Methanobacterium thermoautotrophicum* auf Grund ihrer Enzymausstattung in Gegenwart von Sauerstoff überleben können (Meile *et al.*, 1995; Kiener und Leisinger, 1983). Die Anwesenheit einer Superoxiddismutase und/oder einer Katalase bestimmt bei den anaeroben Organismen über die Sauerstofftoleranz. So auch bei den Methanogenen: die meisten besitzen eine Eisen-Superoxiddismutase (u.a. Brioukhanov *et al.*, 2002; Brioukhanov *et al.*, 2000; Kirby *et al.*, 1981), welche die Zellen vor reaktiven Sauerstoffverbindungen schützt. *Methanosarcina* spp. und *Methanobrevibacter* spp., als Sauerstoff-unempfindlichste Methanogene (Seedorf *et al.*, 2004), besitzen auch eine Häm-Katalase (Shima *et al.* 2001, Shima *et al.*, 1999). Seedorf *et al.* (2004) beschreiben für *Methanobrevibacter abortiphilus* zusätzlich das Vorhandensein einer Coenzym F₄₂₀ abhängigen Oxidase, die an der Sauerstoffentgiftung beteiligt ist. Die Methanogenen besitzen also die enzymatische Ausstattung, um auch in sauerstoffhaltigen Umgebungen zu leben und zu überleben.

Obwohl die Bedingungen in Kompostmieten für eine kontinuierliche Methanbildung nicht optimal erscheinen, reichen sie dennoch aus, thermophile Methanogene zu aktivieren. Es muss also davon ausgegangen werden, dass es in den Kompostmieten zur Bildung anoxischer Bereiche kommt. Dies konnte bei der Analyse der Gasatmosphäre in der untersuchten Kompostmiete bestätigt werden, da über die gaschromatographische Messung der Gasproben kein Sauerstoff nachzuweisen war (Abschnitt 3.1). Die rasche Bildung dieser anoxischen Bereiche im Kompost ist sicherlich nicht verwunderlich, da solche Effekte z. B. schon in Kompostpartikeln von 2 mm Durchmesser auftreten können (Krogmann, 1994). Der Sauerstoff, der über den Wasserfilm in das Material diffundiert, wird durch aerobe Mikroorganismen so schnell aufgebraucht, dass es zur Diffusionslimitierung kommt und eine Sauerstoffversorgung im Inneren der Partikel nicht

mehr gewährleistet ist. So zeigten auch Jäckel *et al.* (2001), dass die Inkubation von Reisfeldbodenaggregaten mit einem Durchmesser von > 6 mm unter oxischen Bedingungen zur Bildung und Emission von Methan führte. Auch die durch die erhöhten Temperaturen im Kompost gesteigerte Diffusionsgeschwindigkeit reicht nicht aus, um alle Bereiche mit Sauerstoff zu versorgen, da die hohen Temperaturen auch zu einer verringerten Sauerstofflöslichkeit im Wasser führen (Lott Fischer *et al.*, 2001).

Das hohe Methanbildungspotential und die hohen Methankonzentrationen innerhalb der Kompostmieten lassen auf einen intensiven Methankreislauf schließen, an dem Mikroorganismen beteiligt sind, die optimal an die hohen Temperaturen während des Kompostierungsprozesses adaptiert sind. Geschlossen wird dieser Kreislauf durch die Existenz von thermophilen Methanotrophen. Jäckel *et al.* (2005) detektierten in Kompost neben thermophiler Methanbildung auch ein thermophiles Methanoxidationspotential und konnten somit erstmals die Existenz von thermophilen Methanotrophen in Kompost zeigen. Eine optimale Methanoxidation fand in dem untersuchten Material bei 45 °C und 55 °C statt. Die Quantifizierung der methanotrophen Bakterien ergab Zellzahlen zwischen $1,8 \times 10^6$ bis zu $3,2 \times 10^7$ pro g-TG. Es konnte der methanotrophe Stamm KTM-1 isoliert werden, der eine 99 %ige 16S rRNA-Gensequenzähnlichkeit zu dem thermophilen Typ I Methanotrophen *Methylocaldum szegediense* zeigte. Halet *et al.* (2006) stellten über RNA basierende DGGE-„Fingerprints“ fest, dass sich die Zusammensetzung der Typ I Methanotrophen während eines Kompostierungsprozesses beim Übergang der mesophilen in die thermophile Phase vollständig veränderte. Auch in der vorliegenden Arbeit konnten Hinweise auf thermophile Methanoxidation im fertigen CC Kompostmaterial gefunden werden. Nach Zugabe von Sauerstoff zu anoxischen Inkubationen bei 50 °C konnte eine deutliche Abnahme des zuvor akkumulierten Methans in der Flaschenatmosphäre bei Sauerstoffkonzentrationen $> 8\%$ beobachtet werden (Abbildung 21).

4.2 Diversität methanogener *Archaea* in Kompostmaterial

Um detaillierte Ergebnisse zur Diversität von Methanogenen in Kompostmaterial zu erlangen, wurde CC Kompostmaterial mittels drei unterschiedlicher Methoden untersucht. Die Klonierungsanalyse und die T-RFLP „Fingerprinttechnik“ wurden für drei unterschiedlich alte Kompostmaterialien durchgeführt. Die SSCP Analyse mit

anschließender Klonierung isolierter einzelsträngiger DNA wurde nur auf reifen CC Kompost angewendet. Im Folgenden werden die Ergebnisse der drei Methoden verglichen, um so einen Überblick über die im Kompostmaterial vorkommenden methanogenen *Archaea* zu erhalten (Tabelle 14).

Mittels der Klonierung konnte gezeigt werden, dass der Hauptteil der untersuchten Klone im 6 Wochen alten CC Kompostmaterial ein Insert mit der höchsten Sequenzähnlichkeit zu 16S rRNA-Gensequenzen von Mitgliedern der Gattung *Methanothermobacter* aufwies (Abbildung 11). Diese Dominanz konnte über die T-RFLP Analyse bestätigt werden, da der dominierende Peak im „Fingerprint“ des 6 Wochen alten Materials der Familie *Methanobacteriaceae* zugeordnet werden konnte (Abbildung 14). Diese Familie beinhaltet moderat thermophile methanogene *Archaea*, die mittels Kultivierung auch in Champignonkompost gefunden wurden (Derikx *et al.*, 1989).

Die überwiegende Anzahl der in der 16S rRNA-Klonbibliothek erfassten Sequenzen aus dem 8 Wochen alten und reifen Material konnte der Spezies *Methanosarcina thermophila* zugeordnet werden (Abbildung 11). Auch hier bestätigte die T-RFLP Analyse das Ergebnis, da der aus reifem Kompostmaterial erzeugte „Fingerprint“ ein dominierendes 16S rRNA-Fragment aufwies, welches der Gattung *Methanosarcina* zugeordnet werden konnte (Abbildung 14). In diesem Zusammenhang lieferte die SSCP-„Fingerprintanalyse“ für das reife CC Kompostmaterial zusätzliche Informationen.

In drei unterschiedlichen Banden eines „Fingerprints“ von reifem CC Kompostmaterial konnten 16S rRNA-Gensequenzabschnitte detektiert werden, die jeweils die höchste Sequenzübereinstimmung zum 16S rRNA-Gen von *Methanosarcina thermophila* (M59140) zeigten (KT1, KT2, KT10, Tabelle 10). Diese Beobachtung könnte ein Hinweis auf unterschiedliche 16S rRNA-Genoperons im Genom von *Methanosarcina thermophila* sein. Ein Alignment zeigte, dass sich die Sequenzen KT1 und KT2 in mindestens fünf Basen unterschieden, die Sequenzen KT1 und KT10 in einer Base und die Sequenzen KT2 und KT10 in mindestens vier Basen (Abbildung 34). Die geringen Sequenzunterschiede können ausreichen, um unterschiedliche Sekundärstrukturen auszubilden und somit im SSCP-Gel aufgetrennt zu werden. Diese Vermutung wurde durch den SSCP-„Fingerprint“ einer Reinkultur von *Methanosarcina thermophila*, der ebenfalls die ausgeprägten drei Banden zeigte, bestätigt (Abbildung 23). Mit Bezug auf die 16S rRNA-Gen Operonanzahl sind in der Gattung *Methanosarcina* zwar nur drei von neun beschriebenen Spezies näher untersucht (*Methanosarcina acetivorans*, *Methanosarcina mazei* und *Methanosarcina barkeri*), allerdings besitzen alle diese näher charakterisierten Spezies drei 16S rRNA-

Genkopien (persönliche Mitteilung von Thomas M. Schmidt, Department of Microbiology and Center for Microbial Ecology, Michigan State University). Diese Eigenschaft ist somit vermutlich auf mehrere Mitglieder innerhalb der Gattung *Methanosarcina* übertragbar.

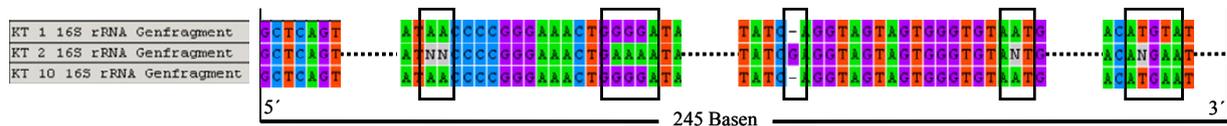


Abbildung 34

Ausschnitt des MEGA 3 Alignments von Sequenzen der drei 16S rRNA-Genfragment-Inserts der Klone KT1, 2 und 10. Die Klone wurden aus SSCP-Bandenausschnitten eines „Fingerprints“ von reifem CC Kompostmaterial generiert. Basenunterschiede sind durch schwarze Kästchen hervorgehoben.

Methanosarcina thermophila wird als ein vorwiegend Acetat verwertender Organismus beschrieben (Boone und Mah, 2001). Der hohe Anteil an *Methanosarcina thermophila* in dem untersuchten CC Kompostmaterial ist erstaunlich, da für viele andere anthropogene Habitats gezeigt wurde, dass die hydrogenotrophen Methanogenen die Acetogenen zahlenmäßig weit übertreffen. In anaeroben mesophilen Biogasreaktoren z. B. beträgt der Anteil an acetogenen Methanogenen gegenüber Wasserstoff nutzenden Methanogenen nur 0,001 % bis 0,4 % (Ahring, 1995). Unterschiedliche Studien weisen darauf hin, dass auch in anderen anthropogenen Habitats, wie Mülldeponien, die hydrogenotrophen Methanogenen überwiegen (Chaban *et al.*, 2006). Chen *et al.* (2003) beschrieben für drei unterschiedlichen Tiefen einer Siedlungsabfalldeponie ebenfalls eine höhere Methanbildung aus H_2 . Die Dominanz von acetogenen Methanogenen im Kompost ist ausserdem überraschend, da bislang vermutet wurde, dass mit steigenden Temperaturen auch der Anteil an der Methanogenese aus H_2/CO_2 ansteigt und bei Temperaturen von 50 °C im Reisfeldboden Methan sogar ausschließlich aus H_2/CO_2 gebildet wird (Fey *et al.* 2001). Dies steht im Widerspruch zu den Ergebnissen von Levén *et al.* (2007), in deren Arbeit, ähnlich wie in der vorliegenden, eine Dominanz von *Methanosarcina thermophila* ähnlichen Sequenzen in der thermophilen Phase eines Biogasreaktors mit organischem Hausmüll gefunden wurde. Ein Erklärungsansatz für die Dominanz von *Methanosarcina thermophila* gegenüber hydrogenotrophen Methanogenen in Biogasreaktoren und Kompost könnte in der Tatsache zu finden sein, dass *Methanosarcina thermophila* unter bestimmten Voraussetzungen auch H_2/CO_2 als Substrat verwerten kann. Mladenovska und Ahring (1997) spekulierten, dass z. B. Methanol stimulierend auf die Methanbildung aus H_2/CO_2

wirken könnte. In Biogasreaktoren sowie in Kompost ist vom Vorhandensein von Methanol auszugehen, das beim Abbau von Pektinen entsteht. Diese Polysaccharide kommen ubiquitär in Pflanzenmaterial vor. Die Carboxylgruppen der Galacturonsäurereste, aus denen Pektin aufgebaut ist, sind zum Teil mit Methanol verestert (Belitz *et al.*, 2001), welches bei der enzymatischen Spaltung frei wird. Methanol kann als Substrat für *Methanosarcina thermophila* fungieren und zusätzlich die Methanbildung dieses Methanogenen aus H_2/CO_2 steigern.

Im reifen Kompostmaterial konnten über die Klonierungsanalyse Mitglieder des Rice Cluster I (RC-I) nachgewiesen werden (Abbildung 11, Abbildung 13). Dies wurde auch mittels T-RFLP Analyse bestätigt, da der T-RF mit einer Länge von 395 bp laut Fey *et al.* (2001) dem Rice Cluster I zugeordnet werden konnte. Die Mitglieder dieses Clusters wurden in mehreren Studien im Wurzelraum von Reispflanzen detektiert (z.B. Grosskopf *et al.*, 1998b; Ramakrishnan *et al.*, 2001; Wu *et al.*, 2005), und es konnte festgestellt werden, dass diese RC-I Methanogenen den Hauptteil der Methanproduktion in Reisfeldböden bewerkstelligen (Erkel *et al.*, 2006). Erst kürzlich konnte ein Stamm des RC-I isoliert werden (Sakai *et al.*, 2007). Fey *et al.* (2001) beobachteten in Reisfeldboden, dass RC-I Methanogene fast ausschließlich in bei 45 °C oder 50 °C inkubiertem Boden zu finden waren, und bei diesen Temperaturen die Methanbildung ausschließlich über H_2/CO_2 als Substrat stattfand. Allerdings waren die Mitglieder des RC-I bis vor Kurzem noch nicht zu kultivieren. Bestätigt wurden die Ergebnisse von Fey *et al.* (2001) zunächst aber von der Arbeitsgruppe um Erkel (2006). Sie kamen über einen Ansatz, bei dem das vollständige Genom eines RC-I Archaeons aus einer Mischkultur (Erkel *et al.*, 2005) analysiert wurde, zu dem Ergebnis, dass die RC-I Methanogenen vermutlich obligat hydrogenotroph sind und auf Grund spezieller enzymatischer Mechanismen reaktive Sauerstoffverbindungen schnell entgiften können (Erkel *et al.*, 2006). Somit verschafft ihnen die Fähigkeit, die Gegenwart von Luftsauerstoff zu tolerieren, einen Vorteil bei der Besiedlung des Habitats Reiswurzel. Auch in anderen Ökosystemen, in denen sich sauerstofffreie und sauerstoffhaltige Bedingungen abwechseln (tropische Böden, Mooregebiete, geflutete Uferböden), ebenso wie im Kompostmaterial, könnte diese Eigenschaft von Vorteil sein. Die hohen Temperaturen im Kompostmaterial im Zusammenhang mit dem Vorkommen von RC-I Methanogenen führen zu der Vermutung, dass die in der vorliegenden Arbeit identifizierten RC-I Methanogenen moderat thermophile Organismen sind. Der Arbeitsgruppe um Sakai (2007) gelang es mit Hilfe des Ansatzes der „Ko-Kultivierung“

einen Stamm der RC-I Methanogenen bei 37 °C zu kultivieren. Ein Vergleich dieses Stammes mit dem Metagenom von Erkel *et al.* (2006), welches aus einer bei 50 °C inkubierten Mischkultur generiert wurde, zeigte lediglich eine Sequenzähnlichkeit von 92 %. Daraufhin spekulierten Sakai *et al.* (2007), dass sowohl mesophile als auch thermophile Mitglieder dieses Clusters in Reisfeldböden existieren. Der Vergleich der in dieser Arbeit erhaltenen RC-I Sequenzen (Abbildung 13, KT 36 (AM418693) und KT 23 (AM418694)) mit denen von Sakai *et al.* (2007, Stamm SANAE, AB196288) und Erkel *et al.* (2006, AM114193) ergab, dass die Sequenzen KT 36 und KT 23 eine 100 %ige bzw. 99,6 %ige Ähnlichkeit zu der Sequenz von Erkel *et al.* (2006) besaßen (Daten nicht gezeigt). Dahingegen war nur eine 91 %ige bzw. 91,1 %ige Ähnlichkeit zu der Sequenz des Stammes SANAE vorhanden. Dies ist ein Beleg dafür, dass die in der vorliegenden Arbeit identifizierten RC-I Methanogenen moderat thermophil sind und Temperaturen von ca. 50°C bevorzugen.

Ein weiterer moderat thermophiler Methanogener der sich im reifen CC Material über die Klonierungsanalyse und den SSCP-„Fingerprint“ nachweisen ließ war *Methanobacterium formicicum* (Abbildung 11, Tabelle 10). Mit einem Anteil von 11,6 % der analysierten Klone gehört auch dieses Archaeon zu den Hauptvertretern im reifen Kompostmaterial. Die Ergebnisse der T-RFLP sprechen dafür, dass dieser Methanogene ebenfalls im 6 Wochen und 8 Wochen alten Materialien vertreten ist. *Methanobacterium formicicum* nutzt H₂/CO₂ als Substrat und wird oft als dominierend in anaeroben Biogasreaktoren beschrieben (Godon *et al.*, 1997; Kobayashi *et al.*, 1988; Macario und De Macario, 1988). Ein OTU, welches 2,3 % der analysierten Klone im reifen Material ausmachte, konnte mittels Klonierung dem Rice Cluster III (RC-III) zugeordnet werden. Dieses Cluster repräsentiert eine noch unkultivierte Linie innerhalb der Subdomäne der *Euryarchaea*, die in Reisfeldböden (Ramakrishnan *et al.*, 2001; Chin *et al.*, 1999; Grosskopf *et al.*, 1998b) und in Bodenproben gefluteter Uferregionen detektiert wurde (Kemnitz *et al.*, 2004). Kemnitz *et al.* (2005) spekulierten, dass es sich bei dem von ihnen angereicherten RC-III um einen heterotrophen, anaeroben, mesophilen Mikroorganismus handelt, welcher vermutlich Oligopeptide für sein Wachstum nutzt. Weiterhin vermuteten sie, dass RC-III *Archaea* von Produkten sich zersetzender Zellen von Organismen im selben Habitat abhängig sind. Aus dieser Sicht könnte Kompost einen idealen Lebensraum für diese Organismengruppe darstellen, da auf Grund bisheriger Ergebnisse mit einem hohen Turnover von Zellen während des Kompostierungsprozesses gerechnet werden muss. Einerseits ist die Anzahl an Zellen pro Gramm Kompostmaterial während des

Kompostierungsprozesses sehr stabil (Ishii *et al.*, 2000). Dies bestätigten auch Riddech *et al.* (2002), die zeigten, dass der mikrobielle Kohlenstoff von Tag 42 bis Tag 240 während eines Kompostierungsprozesses von organischem Abfall nur um den Faktor 3,6 abnahm. Ausserdem stellten Hellmann *et al.* (1997) fest, dass die Konzentration an Fettsäuren der Phospholipide während einer Kompostierung lediglich in einem Bereich von 1300 und 650 nmol pro g-TG des Materials schwankten. Andererseits wurde jedoch mit Hilfe molekularbiologischer Methoden oder der PLFA-Analyse festgestellt, dass es während eines Kompostierungsprozesses zu einer deutlichen Veränderung der Bakterienpopulation kommt (z. B. La Montagne *et al.*, 2002; Ishii *et al.*, 2000; Peters *et al.*, 2000; Hellmann *et al.*, 1997; Herrmann und Shann, 1997). Somit muss in diesem Zusammenhang von einem hohen Turnover von Mikroorganismen ausgegangen werden.

Über die Klonierungsanalyse wurden im reifen Kompostmaterial ebenfalls Sequenzen detektiert, die den nicht methanogenen *Archaea* des Rice Cluster IV der Subdomäne der *Crenarchaea* zugeordnet werden konnten. Nah verwandte Sequenzen wurden in anaeroben Biogasreaktoren gefunden (Chouari *et al.*, 2005; Hougaard & Westermann, nicht veröffentlicht; Abbildung 13). Die ersten Sequenzen dieses Clusters wurden von Hershberger *et al.* (1996) in Flachwasser-Sedimenten gefunden. Später wurden sie auch an Reisswurzeln, in Reisfeldböden, Torf- und Marschböden gefunden (Lu *et al.*, 2006; Kemnitz *et al.*, 2004; Kotsyurbenko *et al.*, 2004; Lueders *et al.*, 2000; Großkopf *et al.*, 1998b). Bis zum heutigen Zeitpunkt ist über die ökologische Funktion dieser *Crenarchaea* nichts bekannt. Der Nachweis dieser Sequenzen in Kompostmaterial weist auf einen weiteren wichtigen anthropogenen Lebensraum, ergänzend zu den erwähnten Habitaten des RC-IV, hin. Die vergleichende Verrechnung der unterschiedlichen 16S rRNA-Gensequenzen zeigte deutliche Unterschiede in den Sequenzen von Abfallbehandlungsanlagen und denen aus Böden. Daraus lässt sich ableiten, dass die Mitglieder des von uns als WTP (Waste Treatment Plant) bezeichneten Clusters („WTP-Cluster“, Abbildung 13) auf eine andere ökologische Nische spezialisiert sind, als die RC-IV *Archaea*, die in Böden gefunden werden.

Über die T-RFLP und die SSCP Methode konnte ein weiterer Methanogener nachgewiesen werden, der nicht in der angelegten Klonbibliothek vorhanden war: *Methanoculleus thermophilus*. In 6 Wochen altem und 8 Wochen altem CC Material konnte dieser Methanogene über die T-RFLP nachgewiesen werden, und im reifen Kompostmaterial über T-RFLP und SSCP. *Methanoculleus thermophilus* ist ein thermophiler Methanogener der Familie *Methanomicrobium*. Mit einem Wachstumsoptimum bei 55 °C (Zellner, 2001)

findet diese Spezies ideale Bedingungen in den Kompostmieten. Die höchste potentielle Methanbildung in den unterschiedlichen Materialien findet in diesem Temperaturbereich statt (Tabelle 9).

Tabelle 14

Übersicht über die, mit unterschiedlichen Methoden in verschieden alten CC Kompostmaterialien, detektierten Gattungen methanogener *Archaea*.

Methode	Alter CC Kompost	Gattung					RC I	RC III	RC IV
		<i>Methanothermobacter sp.</i>	<i>Methanosarcina sp.</i>	<i>Methanoculleus sp.</i>	<i>Methanobacterium sp.</i>	<i>Methanosaeta sp.</i>			
Klonierung	6 Wochen	+	+						
	8 Wochen	+	+						
	reif		+		+		+	+	+
T-RFLP	6 Wochen		+	+	+	+			
	8 Wochen		+	+	+				
	reif		+	+	+		+		
SSCP	reif		+	+	+				

Die Unterschiede zwischen den Ergebnissen der Klonierung und der T-RFLP Methode in Bezug auf die drei untersuchten Kompostmaterialien sind in sofern nicht überraschend, da die PCR für die T-RFLP Analyse mit anderen Primern als die zur Klonierung benötigte PCR durchgeführt wurde. Obwohl beide Primerpaare für die Domäne der *Archaea* als spezifisch beschrieben sind und an ähnliche Regionen auf dem 16S rRNA-Gen binden (Tabelle 1), ist es sehr wahrscheinlich, dass unterschiedliche Affinitäten zu unterschiedlichen Spezies bestehen und somit schon während der Amplifikation verschiedene *Archaea* selektiert wurden. Dadurch, dass bei der T-RFLP theoretisch alle in der Probe vorhandenen 16S rRNA-Genfragmente verdaut und detektiert werden und bei der Klonierung als Selektionsfaktor die Anzahl an untersuchten Klonen dazu kommt (hier ca. 45 Stück pro Probe), ist davon auszugehen, dass die T-RFLP in diesem Fall ein höheres Auflösungsvermögen in Bezug auf die Diversität der Sequenzen in einer Probe hat. Die T-RFLP wird als hoch reproduzierbar beschrieben sowie als eine Methode, die zum schnellen Vergleich von mikrobiellen Gemeinschaften besonders geeignet ist (Liesack und Dunfield, 2002). Die Eigenschaft dieser Methode, dass mehrere auch weniger eng verwandte Spezies zur Bildung desselben T-RF führen können, macht sie jedoch ungeeignet zur Bestimmung von Diversitätsindices (Dunbar *et al.*, 2000). Ebenfalls ist keine genauere Zuordnung der T-RFs zu einzelnen Spezies möglich. Ausserdem kann keine weiteren Charakterisierungen

der TR-Fs geleistet werden, so wie es bei der SSCP Analyse über eine anschließende Klonierungsanalyse und Sequenzierung möglich ist.

Abschließend kann gesagt werden, dass über alle drei Ansätze gezeigt werden konnte, dass *Methanothermobacter* spp., *Methanosarcina thermophila*, *Methanobacterium formicicum* und *Methanoculleus thermophilus* die dominierenden thermophilen Methanogenen innerhalb einer sehr viel diverseren Gemeinschaft von bislang nicht kultivierten *Archaea* im Kompostmaterial darstellen.

Auf Grund der Inhomogenität des Kompostmaterials, unterschiedlicher Zusammensetzungen der Ausgangsmaterialien, z. B. durch jahreszeitliche Schwankungen und geografische Lage der Einzugsgebiete unterschiedlicher Kompostierungsanlagen, sowie durch Anwendung verschiedener Prozessierungen, ist es über den in der vorliegenden Arbeit gewählten Ansatz nicht möglich, eine vollständige Aussage über methanogene Populationen in Kompost zu treffen. Dass sich die Zusammensetzung von methanogenen Gemeinschaften in verschiedenen Kompostmaterialien unterscheidet, zeigte der Einsatz spezifischer Primer für die drei thermophilen methanogenen Spezies *Methanosarcina thermophila*, *Methanoculleus thermophilus* und *Methanothermobacter* sp.. Bei den untersuchten Komposten MC, UC, SC, PC und GC führte die PCR für keine der Spezies zu einer Amplifikation (Tabelle 11), trotz deutlich detektierbarem Methanbildungspotential (Tabelle 9). Dies könnte darauf zurückgeführt werden, dass in diesen Materialien andere thermophile Methanogene als in dem untersuchten CC Kompostmaterial für die Methanbildung verantwortlich sind. Die in der vorliegenden Arbeit erlangten Ergebnisse sind somit als Momentaufnahme zu sehen, stellen aber die bisher einzige detaillierte Erhebung von methanogenen Populationen in Komposten dar.

4.3 Veränderung der Diversität im Laufe des Kompostierungsprozesses

Mit Hilfe molekularbiologischer Methoden und der PLFA-Analyse wurden in früheren Studien deutliche Veränderungen der Bakterienpopulation während des Kompostierungsprozesses beobachtet (z. B. La Montagne *et al.*, 2002; Ishii *et al.*, 2000; Peters *et al.*, 2000; Herrmann und Shann, 1997). Hellmann *et al.* (1997) zeigten über eine PLFA-Analyse, dass die Zunahme von methanogenen *Archaea* mit dem Anstieg der Methanemission aus Kompost korrelierte, so dass auch von einer Veränderung der methanogenen Population ausgegangen werden muss. Cahyani *et al.* (2004) zeigten zwar

eine Sukzession von *Archaea* während der Kompostierung von Reisstroh mittels DGGE, konnten aber keine Methanogenen während der thermophilen Phase detektieren. Bislang gibt es somit nur ungenügende Untersuchungen zur Veränderung der *Archaea* Population während des Kompostierungsprozesses. Die Beobachtung unterschiedlicher Temperaturoptima für die Methanbildung in anoxischen Inkubationen von unterschiedlich altem CC Material lieferte erste deutliche Hinweise auf eine veränderte Zusammensetzung der methanogenen *Archaea* Gemeinschaft (Abbildung 10).

Untersuchungen mittels T-RFLP und Klonierungsanalysen von 6 Wochen, 8 Wochen und reifem Material bestätigten eine Veränderung der methanogenen Population im Verlauf der Reifung des CC Kompostmaterials (Abschnitt 4.2). So konnte über die Klonierung gezeigt werden, dass aus dem 6 Wochen alten Material 86 % der erzeugten Klone 16S rRNA-Gen-Inserts enthielten, die die höchste Sequenzähnlichkeit zu Genen der Gattung *Methanothermobacter* zeigten. Im 8 Wochen alten und reifen Material wurde hingegen die überwiegende Anzahl an Klonen mit anteilig 66 % bzw. 56 % der Spezies *Methanosarcina thermophila* zugeordnet. Das reife Kompostmaterial wies insgesamt sowohl die größte Anzahl an unterschiedlichen OTUs in der Klonbibliothek auf, als auch mittels T-RFLP Analyse die meisten unterschiedlichen TR-Fs im Vergleich zu dem 6 Wochen und 8 Wochen alten Kompost (Abbildung 11, Abbildung 14). Diese Ergebnisse wurden durch die Ermittlung des Shannon Index H' , der das Maximum an Diversität im reifen Kompostmaterial mit einem Wert von 1,394 anzeigte, bestätigt (Abschnitt 3.4.2.2). Auch die „Rarefaction“-Analyse zeigte für das reife CC Kompostmaterial, dass ein größerer Stichprobenumfang an untersuchten Klonen eine höhere Anzahl an detektierten OTUs zur Folge gehabt hätte, während im 6 Wochen alten und 8 Wochen alten Material genügend Klone untersucht wurden, um die dominanten *Archaea* Spezies zu erfassen (Abbildung 12). Dieses Ergebnis wurde durch die berechnete „Coverage“ C bestätigt. Für das 6 Wochen alte und 8 Wochen alte Material betrug der Wert von C 100 %. Für das reife Kompostmaterial zeigte der Wert hingegen eine nur zu 95 % detektierte Diversität an. Weiterhin konnten mit Hilfe der spezifischen Primersysteme (Abschnitt 4.3.1) thermophile Spezies wie *Methanoculleus thermophilus* und Spezies der Gattung *Methanothermobacter* in reifem CC Kompostmaterial nachgewiesen werden, die über die Klonierung hier nicht erfasst wurden. Somit kann in dem reifen Material von einer sehr viel höheren Diversität von Methanogenen, als die über die Klonierungsanalyse detektierte, ausgegangen werden. Ein Grund für die ansteigende Diversität im Verlauf des Kompostierungsprozesses könnte die abfallende Temperatur während der Reifung des Materials sein. Im reifen

Kompostmaterial wurden im Vergleich zu den 6 und 8 Wochen alten Mieten die niedrigsten durchschnittlichen *in situ* Temperaturen (ca. 51,2 °C) registriert. Ein Ansteigen der Bakterien- und Pilz-Diversität während der späten und eher mesophilen Reifephase des Komposts wird im Allgemeinen „Rekolonisation“ bezeichnet (Lott Fischer *et al.*, 2003). Als optimale Temperaturen für die höchste mikrobielle Diversität werden Temperaturen zwischen 35 °C und 40 °C beschrieben (Stentiford, 1996). Einen Anstieg in der Diversität der *Archaea* beobachteten auch Cahyani *et al.* (2004) während der Kompostierung von Reisstroh, nachdem die Mientemperatur unter 50 °C fiel.

4.3.1 Einfluss der Temperatur auf die Diversität der Archaea im Kompostmaterial

Der typische Kompostierungsprozess durchläuft mehrere Temperaturphasen. Auf Grund erhöhter mikrobieller Stoffwechselaktivität geht die initiale mesophile Phase der Kompostierung nach einigen Tagen in die thermophile Phase über, die je nach Materialbeschaffenheit bis zu einigen Monaten anhalten kann (Ryckeboer *et al.*, 2003). Sobald die leicht abbaubaren Bestandteile im Kompostmaterial verstoffwechselt sind, übersteigt die Wärmeableitung die Produktion und die Temperatur in der Miete fällt ab. In der Literatur ist die Sukzession von Bakterien in Bezug auf mesophile und thermophile Populationen während der Kompostierung weithin beschrieben (z. B. Halet *et al.*, 2006; Ryckeboer *et al.*, 2003; Ishii *et al.*, 2000). Während dieser unterschiedlichen Temperaturphasen dominieren verschiedene Mikroorganismen im Kompost, wobei jede dieser Gemeinschaften an die spezielle Umgebung angepasst ist (Ryckeboer *et al.*, 2003). Über eine SSCP Analyse mit spezifischen *Archaea*-Primern und anschließender Auswertung der Bandenmuster mittels einer Clusteranalyse, konnte beobachtet werden, dass es zu einer deutlichen Unterscheidung der *Archaea*-Gemeinschaft in Abhängigkeit von der Inkubationstemperatur kam (Abbildung 16). So konnte deutlich zwischen den nicht inkubierten, bei 36 °C bzw. 50 °C inkubierten und bei 65 °C inkubierten Kompostproben unterschieden werden. Die deutlichste Abtrennung wurde jedoch durch die Inkubation bei 65 °C beobachtet. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass die Temperatur einen deutlichen Einfluss auf die dominierende methanogene Population im Kompost hat. Da bei verschiedenen Temperaturen schon nach 6 Tagen eine andere Zusammensetzung der *Archaea* OTUs zu detektieren war, ist davon auszugehen, dass diese Anpassung an hohe Temperaturen sehr schnell passiert. Den Populationsshift der Methanogenen im Verlauf der verschiedenen Temperaturphasen des Kompostierungsprozesses zeigte auch die Bestimmung der potentiellen Methanbildung von CC Kompostmaterial aus

unterschiedlichen Phasen der Kompostierung (Abbildung 10). Auffällig war hier die hohe potentielle Methanbildung des 6 Wochen alten Kompostmaterials bei Inkubationstemperaturen von 70 °C. Im Gegensatz dazu war bei diesen hohen Temperaturen keine potentielle Methanbildung im reifen Kompostmaterial zu detektieren. Die *in situ* Temperaturen in der reifen Kompostmiete lagen mit durchschnittlich 51 °C um mehr als 10 °C unter den Temperaturen in der 6 Wochen alten Miete (Ø 63 °C), und unterstützen somit die Vermutung, dass im reifen Material eine *Archaea* Population dominiert, die niedrigere Temperaturen bevorzugt. Dies wurde durch die Klonierungsanalyse dieser Materialien bestätigt (Abschnitt 4.3). Die im reifen Material vermutlich dominante Spezies *Methanosarcina thermophila* wächst bei niedrigeren Temperaturen (Temperaturoptimum bei ca. 50 °C, Tabelle 1), als die im 6 Wochen alten Material dominanten Methanogenen der Spezies *Methanothermobacter thermoautotrophicus* (Temperaturoptimum bei ca. 65 °C, Tabelle 1).

4.3.2 Einfluss der Substrate auf die Diversität der Archaea im Kompostmaterial

Im 6 Wochen alten Kompostmaterial konnte die überwiegende Anzahl an OTUs Spezies der Gattung *Methanothermobacter* zugeordnet werden, wohingegen im 8 Wochen alten Material hauptsächlich *Methanosarcina thermophila* ähnliche Sequenzen detektiert wurden. Da sich die mittlere Mietemperatur in einer 6 Wochen und einer 8 Wochen alten CC Kompostmiete nur wenig unterscheiden (Thummes *et al.*, 2007a), muss dieser Populationsshift einem anderen regulierenden Faktor zugeschrieben werden. *Methanothermobacter* spp. sind hydrogenotrophe Methanogene, wohingegen Organismen der Spezies *Methanosarcina thermophila* hauptsächlich Acetat, Methanol und Methylamine als Substrat nutzen, allerdings unter bestimmten Umständen auch H₂/CO₂ (Mladenovska und Ahring, 1997). Die Substratzusammensetzung des Kompostmaterials könnte also ebenfalls für die wechselnde methanogene Population verantwortlich sein.

Auch im reifen CC Kompostmaterial konnten vorwiegend *Methanosarcina thermophila* ähnliche Sequenzen gefunden werden. Dies ist ein Hinweis darauf, dass im reifen CC Kompostmaterial unter natürlichen Bedingungen Acetat das Hauptsubstrat darstellt und von vorwiegend acetogenen Methanogenen für die Methanbildung verwendet wird. Bestätigt wurde diese Vermutung durch einen SSCP-„Fingerprint“ von mit Acetat und Wasserstoff inkubiertem reifem CC Kompost (Abbildung 19) und einer anschließenden Clusteranalyse (Abbildung 16). So konnte gezeigt werden, dass sich die methanogene Population durch den Zusatz von Wasserstoff als Substrat auffällig änderte. Die

Bandenmuster der mit Acetat inkubierten Proben konnten nicht klar von denen der Proben ohne Substratzusatz getrennt werden.

4.3.3 Einfluss des pH-Wertes auf die potentielle Methanbildung

In einer früheren Studie wurde das Einsetzen der potentiellen Methanbildung im Kompostmaterial ab einem Mietenalter von 5 Wochen beobachtet (Thummes *et al.*, 2007a). Diese Tatsache wurde mit einem Anstieg des pH-Wertes von 5,8 im 4 Wochen alten Material auf 7,6 im 5 Wochen alten Material in Verbindung gebracht. Die Initialisierung der Methanproduktion in Verbindung mit einem steigenden pH-Wert wurde grafisch schon früher dargestellt (Beck-Friis, 2003; Hellmann *et al.*, 1997), aber nicht diskutiert. Um den Einfluss des pH-Wertes auf die Methanbildung und die Populationsveränderung der Methanogenen zu untersuchen, wurden in der vorliegenden Arbeit Kompostproben mit initial niedrigem pH-Wert mit Kalkmilch versetzt. Diese Kompostproben zeigten im Durchschnitt einen um eine Einheit höheren pH-Wert im Vergleich zu den unbehandelten Proben (pH 5,2). Nach 5 tägiger anoxischer Inkubation bei 50 °C konnte in den Inkubationen mit Kalkmilch eine um das 20 bis 40-fach höhere Methankonzentration in der Flaschenatmosphäre gemessen werden (Abbildung 17). Die Begründung dieser Ergebnisse ist darin zu vermuten, dass das pH-Optimum der methanogenen *Archaea* im neutralen bis leicht alkalischen Bereich liegt (Garcia *et al.*, 2000). Auch Derikx *et al.* (1989) beobachteten bei den aus Champignonkompost isolierten thermophilen Methanogenen ein gutes Wachstum bei pH-Werten zwischen 6,3 und 8,5. In leicht saurem Milieu hemmen hohe Konzentrationen an freien Fettsäuren im Porenwasser jedoch die Methanogenese. Dies wurde schon in früheren Studien in Biogasreaktoren und Torfboden bei einem pH-Wert von 4,5 beobachtet (Horn *et al.*, 2003; Anderson *et al.*, 1982). Horn und Kollegen (2003) stellten eine Hemmung der Methanogenese ab 5 mM Acetat in saurem Torfboden fest. Obwohl Acetat von den acetogenen Methanogenen als Substrat genutzt werden kann und es neben Lactat eine der am häufigsten vorkommende Fettsäuren im Kompost ist (Beck-Friis, 2003), kann es in seiner undissoziierten Form toxisch für die Zellen sein. Die geladene Bakterienmembran ist permeabel für Fettsäuren in dieser Form, und da pro sinkender pH-Einheit der Anteil dieser Säuren im Material um den Faktor 10 ansteigt (Scherer, 2001), kann dies gleichzeitig zu einer erhöhten Aufnahme an undissoziierten Säuren in die Zelle führen. Der pH-Wert innerhalb der Zelle ist jedoch höher als im Extrazellulärraum, folglich dissoziieren die Säuren im Inneren der Zelle und führen dort zu einem Absinken des pH-Wertes (Freisetzung von Protonen). Die damit

verbundene Entkopplung der protonenmotorischen Kraft (Horn *et al.*, 2003) kann sogar das Absterben der Zelle hervorrufen (Russell, 1991). Eine hohe Konzentration an undissoziierten Fettsäuren, wie in Kompostmaterial mit niedrigen pH-Werten, kann daher zu einer Hemmung bzw. Abnahme der Methanogenese im Kompost führen.

4.4 Unterschiedliche Komposte

4.4.1 Entwicklung spezifischer Primersysteme

Um thermophile Methanogene schneller und eindeutig in Kompost und anderen Materialien nachweisen zu können, wurde in der vorliegenden Arbeit ein Ansatz zur Entwicklung spezifischer Primersysteme für drei im untersuchten Kompost vorkommende Methanogene durchgeführt.

Die Auswertung der Sequenzen nach Klonierung zur Spezifitätsüberprüfung ergab, dass von den Klonen des für *Methanosarcina thermophila* spezifischen Primersystems alle erhaltenen Sequenzen eine 99 %ige Ähnlichkeit zu der Sequenz von *Methanosarcina thermophila* zeigten. Somit wurde hier eine generelle Spezifität für das Primersystem angenommen.

Das Primersystem für *Methanoculleus thermophilus* erwies sich ebenfalls als spezifisch. Alle acht Klonsequenzen hatten eine 100 %ige Ähnlichkeit zur Sequenz von *Methanoculleus thermophilus*.

Im Gegensatz hierzu konnte für das Primersystem Mtb836f/MB1174r für die Spezies *Methanothermobacter thermoautotrophicus* keine Spezifität festgestellt werden. Fünf der Sequenzen zeigten Ähnlichkeiten zu der ebenfalls thermophilen Spezies *Methanothermobacter wolfeii* und zu *Methanobacterium palustre*. Lediglich zwei Sequenzen wurden identifiziert, die eine 100 %ige Ähnlichkeit zu *Methanothermobacter thermoautotrophicus* aufwiesen. Diese Unspezifität war zu erwarten, da schon im Vorfeld bei der Amplifikation mit diesem Primersystem eine der Negativkontrollen, *Methanobacterium formicicum*, nicht ausgeschlossen werden konnte (Abschnitt 3.6).

4.4.2 Untersuchung verschiedener Komposte und Mist

Die Untersuchung von acht unterschiedlichen Kompostmaterialien bestätigte die Vermutung, dass thermophile Methanogene ubiquitär im Kompost vorhanden sind. Woher die Methanogenen stammen, die in gerotteten Materialien wie Kompost und Mist für das

thermophile Methanbildungspotential verantwortlich sind (Tabelle 9), ist bislang noch ungeklärt.

Wie in Abbildung 25 zu sehen, sind auf dem SSCP-„Fingerprint“ der organischen Materialien die Banden des Methanogenen *Methanosarcina thermophila* nur in den prozessierten Materialien zu erkennen. Das SSCP-Profil des frischen Pferdeapfels PA unterscheidet sich hierbei deutlich von dem des prozessierten Pferdemit PS. Auch über die Identifizierung der Methanogenen in den beiden Materialien mit spezifischen Primern konnte eine positive Amplifikation für *Ms. thermophila*, *Mc. thermophilus* und *Methanothermobacter* sp. nur bei PS festgestellt werden (Tabelle 11). Keine der drei Spezies konnte in der Probe PA detektiert werden. Für die Probe PS scheint daher eine Inokulation mit thermophilen Methanogenen durch den frischen Pferdemit PA unwahrscheinlich.

Cahyani *et al.* (2004) vermuteten, dass der überwiegende Teil der Methanogenen im Reisstrohkompst aus Kontaminationen mit Reisfeldböden stammte. Diese Inokulation wäre durchaus auch für die in dieser Arbeit untersuchten Komposte denkbar, da ein Großteil der in der vorliegenden Arbeit untersuchten überwiegend oxischen Böden eine deutliche thermophile methanogene Aktivität zeigten (Tabelle 12). Grünschnitt und andere pflanzliche Rückstände, die als Ausgangsmaterialien für die Kompostierung dienen, könnten mit Methanogenen aus Böden kontaminiert sein. Eine anschließende Anreicherung der thermophilen Methanogenen während der Kompostierung ist dadurch zu erklären, dass z. B. in der Kompostierungsanlage CC grobe Bestandteile des Kompostmaterials den Kompostierungsprozess mehrmals durchlaufen bis das Material vollständig degradiert ist, so dass es immer wieder zu einer anlageninternen Inokulation des frisch angelieferten Materials kommt.

Vorkommen und Anreicherung verschiedener thermophiler methanogener Spezies scheinen durchaus von dem zu kompostierenden Material abhängig zu sein. Dies wird vor allem deutlich, wenn man die Ergebnisse der SSCP-Analyse, der spezifischen Amplifikation mit unterschiedlichen Primersystemen für thermophile Methanogene und der unterschiedlichen Temperaturoptima der Methanbildung verschiedener Komposte vergleichend betrachtet (Abbildung 35). Die vier Komposte, welche ausschließlich Grünschnitt als Ausgangssubstrat enthielten, konnten nach Auswertung der SSCP-Profile über eine Clusteranalyse deutlich von den Materialien mit Biomüll/Grünschnitt getrennt werden. Die Clusterbildung wurde dadurch bestätigt, dass in den Komposten aus reinen

Grünschnittmaterialien, keine der thermophilen Spezies *Methanosarcina thermophila*, *Methanoculleus thermophilus* und Spezies der Gattung *Methanothermobacter* sp. mit Hilfe von spezifischen Primersystemen über eine PCR nachgewiesen werden konnten. Weiterhin wurden, mit Ausnahme eines Kompostmaterials, unterschiedliche Temperaturoptima in Abhängigkeit vom Ausgangsmaterial beobachtet. Die Temperaturoptima für eine potentielle Methanbildung lagen in den reinen Grünschnittkompostmaterialien und dem NC-Kompost bei 50 °C. Die untersuchten Materialien CC, TC und AC die ein Gemisch aus Grünschnitt und Biomüll bzw. nur Biomüll als Ausgangsmaterial enthielten, zeigten hingegen ein Optimum für die Methanbildung bei Temperaturen zwischen 50 °C und 65 °C bzw. bei 65 °C. Es konnte hier ein Zusammenhang zwischen Temperaturoptimum der potentiellen Methanbildung und positivem PCR-Nachweis von Spezies der Gattung *Methanothermobacter* festgestellt werden. Somit kann vermutet werden, dass Vertreter der Gattung *Methanothermobacter* in den Komposten CC, TC und AC für die Methanbildung bei 65 °C verantwortlich waren, da die optimalen Wachstumstemperaturen für diese Gattung zwischen 55 °C und 65 °C liegen (Tabelle 1).

Mehrere Faktoren können für die Unterschiede in der methanogenen Population der Grünschnittkomposte und Grünschnitt/Biomüll-Komposte in Betracht gezogen werden. Einerseits sind die untersuchten Grünschnittkomposte jeweils weitaus älter (mindestens 1 Jahr, Tabelle 2) und es ist anzunehmen, dass eventuell anfänglich vorhandene thermophile Methanogene, wie z. B. *Methanothermobacter* spp., eine längere Lagerung und den damit verbundenen Abfall der Temperatur zahlenmäßig nicht ausreichend überleben um sie im Material nachweisen zu können. Allerdings stellten Fracchia *et al.* (2006) fest, dass eine Lagerung von reifem Kompost über 12 Jahre keinen deutlichen Einfluss auf die bakterielle Gemeinschaft in diesem Material hatte. Andererseits kann die durch die Ausgangsmaterialien festgelegte Zusammensetzung der Substrate ein weiterer Faktor sein, der die sich ansiedelnde methanogene Gemeinschaft in Grünschnittkomposten und Komposten, die Biomüll im Ausgangsmaterial enthalten, beeinflusst. Auch die unterschiedliche Prozessierung der Komposte nimmt sicherlich Einfluss auf die mikrobielle Population und somit auch auf die Methanogenen. Fracchia *et al.* (2006) bestätigten diese Vermutung für die Bakteriengemeinschaft in Kompost aus Grünschnitt und Biomüll im Vergleich zu Vermikompost (Umsetzung des Materials durch Regenwürmer) mit festen Bestandteilen von Schweine-, Hühner- und Rindermist als Ausgangsmaterial. Die Arbeitsgruppe stellte mit Hilfe der PCR-SSCP fest, dass sich die Bakteriengemeinschaften in diesen Komposten deutlich voneinander unterschieden.

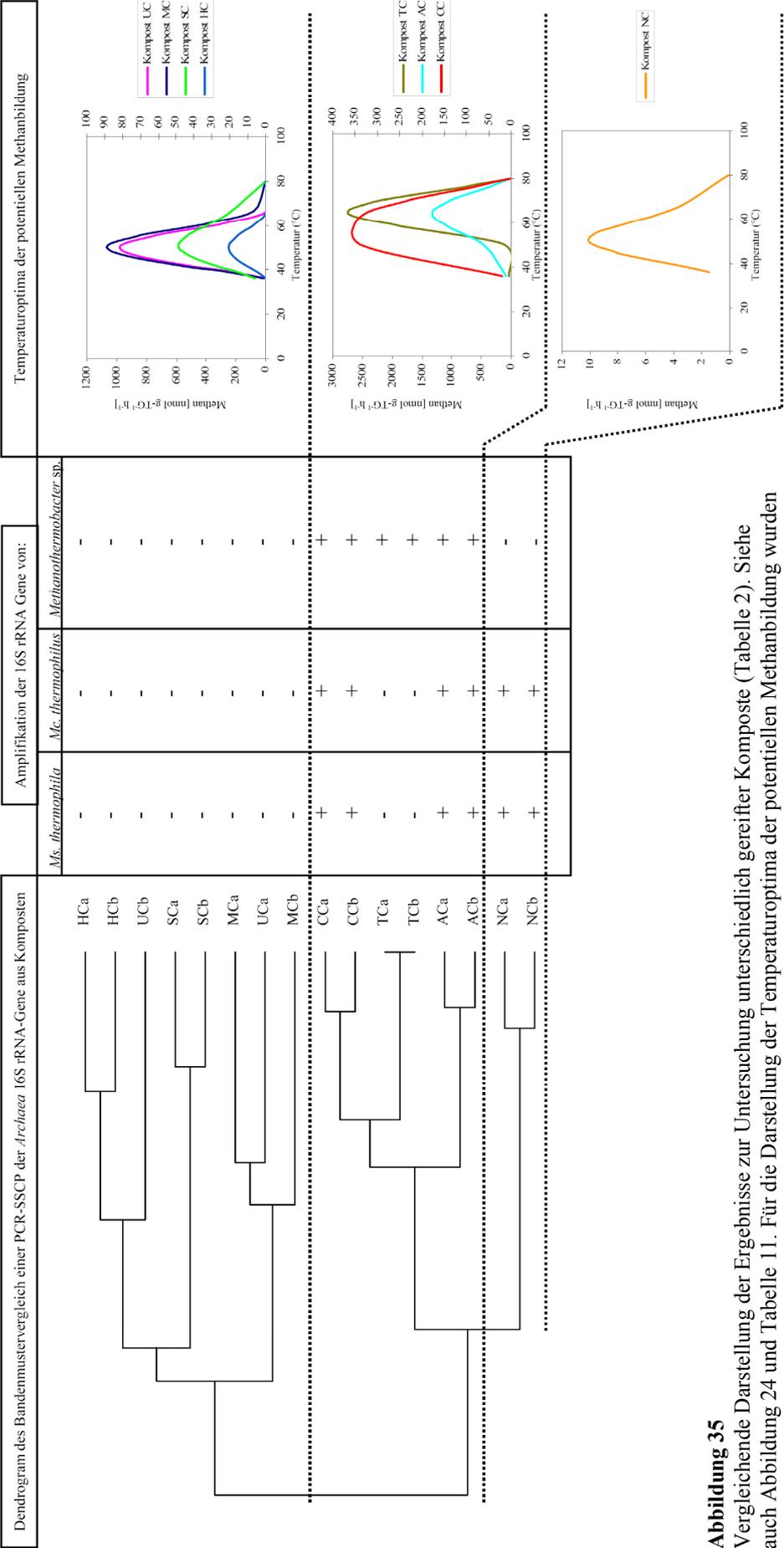


Abbildung 35
 Vergleichende Darstellung der Ergebnisse zur Untersuchung unterschiedlich gereifter Komposte (Tabelle 2). Siehe auch Abbildung 24 und Tabelle 11. Für die Darstellung der Temperaturoptima der potentiellen Methanbildung wurden die Daten der Methanbildungsraten aus Tabelle 9 verwendet.

4.5 Verbreitung thermophiler methanogener *Archaea* über die Kompostierung

4.5.1 Möglichkeit der Verbreitung thermophiler Methanogener über die Luft

Die Herkunft von thermophilen Organismen in kalten oder gemäßigten Umgebungen ist bis heute nicht geklärt. Bonjour *et al.* (1988) diskutierten die Möglichkeit einer Verbreitung von Mikroorganismen aus vulkanischen Habitaten über die Luft. Auch während der Prozessierung von Kompost (Umsetzen, Absieben, etc.) und des Düngevorgangs von Äckern mit Kompost werden hohe Mengen an Kompostmikroorganismen in die Luft freigesetzt (Abbildung 36).



Abbildung 36

Bioaerosolbildung während der Ausbringung von Kompost mit einem Miststreuer auf einen Acker und während des Umsetzens der Kompostmieten auf der Kompostierungsanlage.

Albrecht *et al.* (2005) z. B. zeigten, dass die Konzentrationen während des Umsetzens von Kompostmieten 10^6 bis 10^8 Zellen pro m^3 Luft erreichen. In Verbindung mit den Ergebnissen der hier vorliegenden Arbeit kann vermutet werden, dass während des Umsetzens einer Kompostmiete eine Konzentration von 10^3 bis 10^5 *Archaea*-Zellen pro m^3 in der Luft vorhanden ist, da durchschnittlich etwa 0,1 % der im Kompost vorhandenen Mikroorganismen *Archaea* sind (Abschnitt 3.3). Die Untersuchung von Bioaerosolen, die während des Umsetzens einer Kompostmiete gesammelt wurden, bestätigte diese Vermutung. So zeigte der Vergleich des SSCP-„Fingerprints“ von Kompostmaterial und dem entsprechenden, während des Umsetzens entstandenen Bioaerosols einen hohen visuellen Übereinstimmungsgrad (Abbildung 26B). Diese Tatsache muss auf die entsprechenden *Archaea* in dem Kompostmaterial und dem Bioaerosol zurückgeführt werden. Ausserdem konnte durch die anoxische Inkubation von mit Bioaerosolen beladenen Gelatinefiltern gezeigt werden, dass während des Umsetzungsvorgangs aktive thermophile Methanogene in der Luft vorhanden waren, da innerhalb von kurzer Zeit eine

deutliche Methanbildung bei einer anoxischen Inkubation bei 50 °C einsetzte (Abbildung 26A).

Unter der Annahme einer Windgeschwindigkeit von 1 m s⁻¹ könnten diese Bioaerolsole unter optimalen Bedingungen bis zu 3,6 km in der Stunde transportiert werden und somit zu einer Verbreitung von Kompost getragenen Methanogenen beitragen. Während des Transportes der *Archaea* durch den Wind, sind die Zellen jedoch unterschiedlichen Stressoren, Austrocknung unter oxischen Bedingungen sowie UV-Strahlung, ausgesetzt, die eine Verminderung der Überlebensfähigkeit bedeuten könnten. Die Ergebnisse zur Simulation dieser Stressfaktoren zeigten jedoch eine hohe Resistenz der im Kompost enthaltenen Methanogenen. So konnte im Anschluss an eine Trocknung des CC Kompostmaterials unter oxischen Bedingungen eine hohe Aktivität der Methanogenen, sofort nach Wiederherstellung entsprechender Inkubationsbedingungen, bei 50 °C beobachtet werden (Abbildung 29). Dies ist im Widerspruch zu Fetzer *et al.* (1993) die mit Reinkulturexperimenten zeigten, dass *Methanosarcina barkeri* nach oxischer Austrocknung sowohl eine verringerte Lebensfähigkeit als auch eine abgeschwächte Methanproduktion zeigte. Andere Studien dagegen belegen die Resistenz von Methanogenen auch auf Einzelzellniveau auf Grund ihrer enzymatischen Ausstattung mit Superoxiddismutase und/oder Katalasen (Brioukhanov *et al.*, 2002; Brioukhanov *et al.*, 2000; Meile *et al.*, 1995; Kiener und Leisinger, 1983; Kirby *et al.*, 1981). Wagner *et al.* (1999) beschreiben eine erhöhte Überlebensfähigkeit und Aktivität von Methanogenen unter oxischen Bedingungen auch durch die Anhaftung an Bodenpartikel.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen sogar ein erhöhtes Methanbildungspotential des zunächst getrockneten und anschließend wieder befeuchteten Komposts im Vergleich zu frischem Material (Abbildung 28). Eine Erklärung dieser Beobachtung könnte die erhöhte Verfügbarkeit von organischen Substraten nach dem Austrocknen und Wiederbefeuchten sein. Lufttrocknung löst den Tod von vielen Mikroorganismen aus (Mondini *et al.*, 2001). Marumoto *et al.* (1977) und Bottner (1985) stellten die Hypothese auf, dass durch abwechselnde Trocknungs- und Wiederbefeuchtungsphasen und anschließende Verstoffwechselung von Zytoplasmabestandteilen der abgestorbenen Zellen zusätzlicher Kohlenstoff freigesetzt wird. Dadurch würde den Methanogenen zusätzliches Substrat zur Verfügung stehen. Dementsprechend stellten Mondini *et al.* (2001) fest, dass Kompostproben, die aus der thermophilen Phase der Kompostierung stammten, nach Trocknung und Wiederbefeuchtung eine mikrobielle Biomasse aufwiesen, die höher war als diejenige der frischen Proben. Sie führten diese Ergebnisse ebenfalls auf die

Freisetzung zusätzlicher Substrate nach der Lufttrocknung zurück, die zu einem erhöhten Wachstum der überlebenden Mikroorganismen führten.

Die Resistenz der Methanogenen gegenüber UV-Bestrahlung wurde deutlich, nachdem in bestrahltem Kompostmaterial keine Verringerung des Methanbildungspotentials bei 50 °C im Vergleich zu unbestrahltem Kompost zu beobachten war (Abbildung 29). Dies kann darauf zurückgeführt werden, dass die methanogene Population durch das Kompostmaterial selbst vor der UV-Strahlung geschützt wurde. So zeigten Cockell *et al.* (2002), dass schon eine 500 µm dicke Staubschicht ausreicht, die Inaktivierung von *Bacillus subtilis* Sporen durch UV-Licht um das 50 fache zu verringern. Auch die Studie von Mancinelli und Klovstad (2000) zeigte solche Effekte. Hier wurde gezeigt, dass eine Staubschicht von 1 mm Dicke die Inaktivierung von *Bacillus subtilis* Sporen bei einer Strahlungsintensität von 12 kJ sogar vollständig verhinderte. In dem in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Experiment war zumindest eine Verringerung des Methanbildungspotentials nach der UV-Bestrahlung zu erwarten, da die angewendete hohe Dosis von 82,1 kJ m⁻² sogar das Wachstum von sehr resistenten Stämmen, wie z. B. *Salmonella* sp. *in vitro* hemmt (Allende *et al.*, 2006). Eine gewisse Resistenz der thermophilen Methanogenen gegenüber UV-C Strahlung ist also anzunehmen.

4.5.2 Verbreitung thermophiler Methanogener über die Düngung

Neben der Verbreitung von thermophilen Methanogenen über die Luft, muss auch die Düngung von Böden mit Kompost als Verbreitungsmechanismus angenommen werden. Die Kompostierung wurde schon im alten China und im Römischen Reich als Abfallbehandlungsmaßnahme angewendet. Der Einsatz des Komposts als Bodenverbesserer war damals ebenfalls bekannt. Auch zu dieser Zeit beobachteten die Menschen eine Erhöhung der Temperatur während des Prozesses (Bidlingmeier, 2000). Wenn man also von einer Anreicherung von thermophilen Methanogenen in diesem Material ausgeht, ist mit einer Verbreitung dieser Mikroorganismen durch die Düngung spätestens seit der Anwendung der Kompostierung zu rechnen.

Heute entstehen in Deutschland durch die Kompostierung jährlich bis zu 4 mio t hochwertiger Kompost. Der Hauptteil davon, d. h. ca. 48 %, werden in der Landwirtschaft, in Betrieben ohne Tierhaltung, als Bodenverbesserungsmittel eingesetzt (Bundesgütegemeinschaft Kompost e.V., www.kompost.de) und so über das Boden-Pflanzen-System recycled. Der Kompost wird mit ca. 14,7 t pro ha und Jahr (zulässige Aufbringungsmenge maximal 30 t Trockenmasse Kompost pro ha innerhalb von drei

Jahren (Bioabfallverordnung des Bundesministeriums, www.bmu.de) auf Teile der 12 mio ha Ackerland in Deutschland ausgebracht. Neben der Verringerung des Restmüllvolumens und somit der Entlastung von Mülldeponien führt die Kompostierung so zu einem geringeren Einsatz von künstlichen Düngern (Ros *et al.*, 2006a). Über die Anzahl der Landwirte, die mit Kompost düngen, gibt es bislang keine Erhebungen.

Thummes *et al.* (2007b) untersuchten die Persistenz von Methanogenen aus Kompost in oxischen Böden. Reifer CC Kompost wurde sowohl als Boden-Kompost-Gemisch als auch als reiner Kompost in einen Wiesenboden eingebracht. Im Gegensatz zu den reinen Bodenproben zeigten der ausgebrachte Kompost und das Boden/Kompost-Gemisch nach 24 h anoxischer Inkubation thermophiles Methanbildungspotential bei 50 °C. Diese Beobachtung war unabhängig von der Verweilzeit der Proben im Wiesenboden, so dass auch nach einem Jahr alle Proben mit Kompost ein deutliches thermophiles Methanbildungspotential zeigten. Das Mischungsverhältnis in dem beschriebenen Experiment betrug drei Teile Boden zu einem Teil Kompost. Die eingebrachte Kompostmenge spiegelt nicht die Realität in der Landwirtschaft wieder. Hier werden ca. 10 t Frischmasse Kompost auf einen ha Acker ausgebracht. Es wird empfohlen, den Kompost dabei nicht zu tief in den Boden einzuarbeiten, sondern, anstatt zu pflügen, mit der Egge zu arbeiten. Dies bedeutet, dass beim Einbringen des Komposts bis zu einer Tiefe von 10 cm ein Mischungsverhältnis von Boden zu Kompost von ca. 1:100 entsteht. Auch bei diesem weitaus breiteren Verhältnis konnte in der vorliegenden Arbeit über das thermophile Methanbildungspotential von mit CC Kompost gedüngtem Ackerboden eine Persistenz von Methanogenen aus Kompost beobachtet werden. Die Proben des gedüngten Ackers zeigten schon nach 24 h anoxischer Inkubation ein deutliches Methanbildungspotential bei 50 °C (Abschnitt 3.9.2). Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass die methanogene Population schnell zu aktivieren ist und groß genug, um messbare Mengen an Methan zu bilden. Der SSCP-„Fingerprint“ des mit reifem CC Kompost gedüngten Ackers (AK) und der des reifen CC Komposts ähnelten einander stark (Abbildung 25) und weisen ebenfalls auf eine Persistenz der im Kompost vorhandenen Methanogenen im Ackerboden hin.

Mit Hilfe der Untersuchungen von Bodenproben des Langzeitversuchs der Versuchsstation Linz konnten tiefere Einblicke in Bezug auf den Einfluss der Kompostdüngung auf die Bodenbeschaffenheit und die mikrobielle Gemeinschaft im Boden gewonnen werden. Die Langzeit-Düngung (15 Jahre) mit Grünschnittkompost, Klärschlammkompost,

Rindermistkompost und Kompost aus kommunalen Bioabfällen zeigte einen deutlichen Einfluss auf die Bodenparameter. Eine Clusteranalyse aller verfügbarer Bodendaten (Tabelle 11) ließ eine Auftrennung der Proben entsprechend der Düngevarianten erkennen (Abbildung 32). Ausnahmen bildeten der mit Grünschnittkompost und der mit Kompost aus kommunalen Bioabfällen gedüngte Boden. Bei diesen beiden Varianten war keine eindeutige Auftrennung möglich.

Anhand der potentiellen Methanbildungsraten der unterschiedlich gedüngten Böden bei 50 °C wurde deutlich, dass der mit Grünschnittkompost gedüngte Boden zusammen mit einer Parallele des mit Rindermistkompost gedüngten Bodens die höchste Aktivität zeigte. Der ungedüngte Kontrollboden zeigte die niedrigste Methanbildungsrate (Abbildung 31). Die SSCP-„Fingerprints“ der für 20 Tage anoxisch inkubierten Bodenproben clusterten entsprechend der Höhe ihres Methanbildungspotentiales (Abbildung 30). Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass die verschiedenen Komposte nicht nur die Bodeneigenschaften wie Humusgehalt, Stickstoff und austauschbare Kationen langfristig verändern (Tabelle 4), sondern auch einen Einfluss auf die Mikroorganismengemeinschaft, in diesem Fall auf die Population der *Archaea*, haben. Ob es sich hierbei tatsächlich um einen Eintrag einer kompostspezifischen methanogenen Population in den Boden handelt, oder die, durch die Düngung, veränderten Bodeneigenschaften für die Unterschiede in der methanogenen Aktivität und Population verantwortlich sind, ist nicht klar zu differenzieren.

Auch Ros *et al.* (2006b) und Saison *et al.* (2005) beschrieben, dass die anthropogenen Aktivitäten die mikrobielle Gemeinschaft und Diversität in den kompostgedüngten Böden beeinflussen. Saison *et al.* (2005) stellten fest, dass eine Veränderung der Organismengemeinschaft nach Kompostausbringung auf einen Boden vermutlich auf das Einbringen der Kompostmatrix und somit einen erhöhten Anteil an organischer Substanz zurückzuführen ist. Die Einbringung von kompostgetragenen Mikroorganismen selbst spielte ihrer Meinung nach eine eher untergeordnete Rolle. Des Weiteren konnte diese Arbeitsgruppe nach einem Jahr keine Persistenz der durch Kompost in den Boden eingebrachten Mikroorganismen feststellen. Ros *et al.* (2006a) vermuteten ein Zusammenspiel zweier Faktoren, die für das Ansteigen des mikrobiellen Kohlenstoffs im Boden nach Kompostausbringung verantwortlich waren, einerseits der zusätzliche Eintrag von Substraten und andererseits der direkte Effekt der durch den Kompost in den Boden eingebrachten Mikroorganismen. Analog dazu zeigte die erst kürzlich erschienene Studie

von Gattinger *et al.* (2007), dass Rindermist als organischer Dünger ein Inokulum für Spezies der Gattungen *Methanoculleus* und *Methanosarcina* in Ackerboden darstellt.

Gattinger *et al.* (2007) spekulierten, dass die durch organische Düngung eingebrachten Methanogenen unter sehr feuchten, wassergesättigten Bedingungen im Ackerboden aktiv sein können. Der SSCP-„Fingerprint“ aus dem Boden extrahierter RNA ließ auf eine Aktivität von *Methanosarcina thermophila* in tieferen, wasserreichen Schichten des Bodens schließen. In der Tat ist die Bildung anoxischer Bereiche in Böden nicht selten und somit eine Aktivität von anaeroben Mikroorganismen nicht auszuschließen. In Abhängigkeit von Struktur und Wassergehalt kann ein Sauerstoffmangel z. B. in grundwassernahen Böden (Gleye, Moore), Stauwasserböden (Pseudogleye), verdichteten Böden und Überflutungsbereichen (Aue) entstehen (Scheffer und Schachtschabel, 1998). Gattinger *et al.* (2007) ließen bei ihren Spekulationen allerdings die Tatsache ausser Acht, dass *Methanosarcina thermophila* als moderat thermophiler Methanogener mit einem Wachstumsoptimum von 50 °C vermutlich höhere als die im Ackerboden herrschenden Temperaturen zur Bildung von Methan benötigt. Fey *et al.* (2001) zweifelten aus diesem Grund die Aktivität der vermutlich moderat thermophilen Rice Cluster I Methanogenen in dem von ihnen untersuchten Reisfeldboden an, da im Sommer während der Flutung der Reisfelder die Bodentemperaturen unter 30 °C blieben. In unseren Breiten bei mittleren Aussentemperaturen im Sommer von 25-30 °C (www.wetter.net) ist eine Aktivität und ein Wachstum der thermophilen Methanogenen nicht auszuschließen. Bei grobporigen Böden ist Wasser bei Austrocknung der oberen Bodenschichten durch Abriss der Kapillarfäden als Tiefenwasser vor Verdunstung geschützt (Wolkenhauer, 2003) und würde somit auch bei trockener Witterung den Mikroorganismen zur Verfügung stehen. Breite Temperaturspannen von 22-78 °C für das Wachstum von z. B. *Mtb. thermoautotrophicus* (Wiegel, 1990) könnten so eine methanogene Aktivität bei hohen Sommertemperaturen möglich machen.

Die vorliegenden Ergebnisse bestätigen, dass thermophile Methanogene aus Kompostmaterial in überwiegend oxischen, gemäßigten Böden unter Bedingungen überleben, die sich klar von den Lebensbedingungen in einer Kompostmiete unterscheiden. Die Resistenz gegenüber Sauerstoff (Ueki *et al.*, 1997; Fetzer *et al.*, 1993), Austrocknung und UV-Strahlung zeigt die Widerstandsfähigkeit der Methanogenen, obwohl bisher keine Bildung von Überdauerungsformen bekannt ist. Insgesamt haben die Versuche

gezeigt, dass thermophile Methanogene in mesophilen Habitaten ihren Ursprung in der Vorbehandlung von Böden mit organischem Material als Dünger, oder durch Verbreitung über die Luft haben können.

Als eine der Konsequenzen dieser anthropogenen Verbreitung nennen Gattinger *et al.* (2007) die Verringerung des Potentials von oxischen Böden zur Funktion als Methansenke durch Aufbringung von Rindermist und der damit verbundenen hohen Abundanz und Aktivität methanogener *Archaea* im Boden (Gattinger *et al.*, 2007). Allerdings ist im Bezug auf die Düngung von Böden mit Kompost bekannt, dass diese eher zu einer Steigerung der Aufnahme atmosphärischen Methans führen kann (Seghers *et al.*, 2003; Hütsch, 1998). Quantitativ wurde in der Arbeit von Hütsch (1998) eine Steigerung von 28 % festgestellt. Die Frage, ob und wie lange dieser stimulierende Effekt anhält, ist dabei nicht bekannt.

4.5.3 Vorkommen thermophiler methanogener *Archaea* in nicht wassergesättigten, gemäßigten Böden

Während den Experimenten zu dieser Arbeit wurden Bodenproben (Acker und Wiese) von 29 unterschiedlichen Standorten in Deutschland (Tabelle 3, Abbildung 4) auf vorhandene potentielle methanogene Aktivität untersucht. In 23 Böden konnte ein deutlicher Anstieg der Methanmenge in den anoxischen Inkubationen bei 50°C innerhalb eines Monats gemessen werden. Die kürzeste Inkubationszeit bis zum Einsetzen der Methanbildung betrug hierbei 4 Tage, die längste 18 Tage (Wiesenböden; Abschnitt 3.10.1). Die Lag-Phase bis zum Einsetzen der Methanbildung in den hier untersuchten Bodenproben, konnte indirekt auch über die *Archaea* spezifische PCR beobachtet werden. Während kein PCR-Produkt unter Verwendung der DNA aus den feldfrischen Böden erhalten wurde, wurden deutliche PCR-Produkte am Ende der anoxischen Inkubationen erhalten. Auf Grund dieser Ergebnisse muss sicherlich von einem hohen Verbreitungsgrad thermophiler Methanogener in den oxischen Böden unserer Breiten ausgegangen werden. Jedoch unterscheiden sich die SSCP-Profile visuell sehr deutlich von denen aus den untersuchten Kompostmaterialien.

Die Tatsache, dass bei 25 °C nur 12 von 29 Böden ein potentielles Methanbildungspotential zeigten, bei 50 °C aber 23 dieser Böden, weist darauf hin, dass anscheinend mehr thermophile als mesophile Methanogene vorhanden waren. Dieses Ergebnis liefert so tatsächlich einen Hinweis auf den Eintrag dieser thermophilen Population von Aussen.

5 Allgemeine Schlussbetrachtung

Es gibt unterschiedliche Theorien, die auf das Vorkommen von thermophilen Organismen in denen für sie lebensfeindlichen Habitaten angewendet werden können. Die EIEANS-Theorie („everything is everywhere and nature selects“; Beijerinck, 1913; Baas-Becking, 1934; Finlay, 2002) besagt, dass, unter anderem aus Gründen der Größe, Abundanz und der Stoffwechsellastizität, einzelligen Organismen keine Grenzen in Bezug auf ihre Ausbreitung gesetzt sind. Das würde das Vorkommen thermophiler Mikroorganismen in gemäßigten Habitaten erklären. Diese Hypothese wurde von mehreren Studien angefochten. Whitaker *et al.* (2003) untersuchten hyperthermophile *Archaea* und stellten fest, dass *Sulfolobus* Spezies in unterschiedlichen Arealen von Regionen mit geothermale Einfluss sehr wohl genetische Unterschiede aufwiesen. Er postuliert, dass es Barrieren in der Umwelt gibt, die die Verbreitung der Mikroorganismen verhindern und so die geografische Isolation von Populationen unterstützen.

Die in dieser Dissertation erlangten Ergebnisse geben einen tieferen Einblick in Diversität, Struktur und Dymnamik methanogener *Archaea* in Kompost. Die vorliegende Arbeit stellt somit die erste detaillierte Erhebung methanogener Spezies in Kompostmaterial dar. Es konnte gezeigt werden, dass moderat thermophile Methanbildner wie *Methanosarcina thermophila*, *Methanothermobacter* sp., *Methanobacterium formicicum* und *Methanoculleus thermophilus* zu den dominierenden, bisher kultivierten Spezies während der Kompostprozessierung gehören. Die Gemeinschaft der Methanogenen scheint jedoch wesentlich diverser zu sein und zu einem großen Teil aus bisher unkultivierten *Archaea* zu bestehen. Es konnte gezeigt werden, dass eine Verbreitung dieser Organismen in andere Habitate über die Luft und den Einsatz von Kompost als Dünger möglich ist. Die Entwicklung einer spezifischen *Archaea*-Gemeinschaft entsprechend dem als Dünger eingesetzten Kompost wurde dabei deutlich.

Auf Grund der in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse muss den oben aufgeführten Hypothesen hinzugefügt werden, dass anthropogene Aktivitäten vorhandene Barrieren auflösen können und, wie in unserem Fall, im Bezug auf thermophile Methanogene eine Verbreitung in unterschiedlichste Habitate möglich machen.

6 Literatur

Ahring, B.K. (1995) Methanogenesis in thermophilic biogas reactors. *Antonie van Leeuwenhoek* 67: 91-102.

Albrecht, A., Witzenberger, R., Bernzen, U., Kämpfer, P., Jäckel, U. (2005) Vergleichende Messungen luftgetragener Bakterien mittels Filtration (MD8) und Impingement (AGI 30) in einer Kompostierungsanlage. *Gefahrstoffe Reinhaltung der Luft* 65: 358-362.

Allende, A., McEvoy, J.L., Luo, Y., Artes, F., Wang, C.Y. (2006) Effectiveness of two-sided UV-C treatments in inhibiting natural microflora and extending the shelf-life of minimally processed “red oak leaf” lettuce. *Food Microbiology* 3: 241-249.

Anderson, G.K., Donnelly, T., McKeown, K.J. (1982) Identification and Control of Inhibition in the Anaerobic Treatment of Industrial Wastewaters. *Process Biochemistry* July/August: 28-41.

Auchtung, T.A., Takacs-Vesbach, C.D., Cavanaugh, C.M. (2006) 16S rRNA phylogenetic investigation of the candidate division “Korarchaeota”. *Applied and Environmental Microbiology* 72: 5077-5082.

Ayalon, O., Avnimenelech, Y. (2001) Solid waste treatment as a high-priority and low cost alternative for greenhouse gas mitigation. *Environmental Management* 27: 697-704.

Baas-Becking, L.G.M. (1934) *Geobiologie of inleiding tot de Milieukunde*. The Hague, Van Stockum un Zoon, Holland.

Barker, H.A.(1940) Studies upon the methane fermentation. IV. The isolation and culture of *Methanobacterium omelaianskii*. *Antonie Van Leeuwnhoek* 6: 201-220.

Barns, S.M., Delwiche, C.F., Palmer, J.D., Dawson, S.C., Hershberger, K.L., Pace, N.R. (1996) Phylogenetic perspective on microbial life in hydrothermal ecosystems, past and present. *Ciba Foundation Symposium* 202: 24-32.

Barzegar, A.R., Yousefi, A., Daryashenas, A. (2002) The effect of addition of different amounts and types of organic materials on soil physical properties and yield of wheat. *Plant and Soil* 247: 295–301.

Bassam, B.J., Caetano-Anolles, G., Gresshoff, P.M. (1991) Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamid gels. *Analtical Biochemistry* 196: 80-83.

Beck-Friis, B., Pell, M., Sonesson, U., Jönsson, H., Kirchmann, H. (2000) Formation and Emission of N₂O and CH₄ from Compost Heaps of Organic household Waste. *Environmental Monitoring and Assessment* 62: 317-331.

Beck-Friis, B., Smars, S., Jönssen, H., Eklind, Y., Kirchmann, H. (2003) Composting of Source-Seperated Household Organics at different Oxygen Levels: Gaining an Understanding of the Emission Dynamics. *Compost Science and Utilization* 11: 41-50.

- Beijerinck, M.W. (1913)** De infusies en de ontdekking der bacterien. Jaarboek van de Koninklijke Akademie von wetenschappen, Müller, Amsterdam, Holland.
- Belitz, H.-D., Grosch, W., Schieberle, P. (2001)** Lehrbuch der Lebensmittelchemie, 5., vollständig überarbeitete Auflage. Springer, Berlin-Heidelberg.
- Bender M. und Conrad R. (1992)** Kinetics of CH₄ oxidation in oxic soils exposed to ambient air or high CH₄ mixing ratios. FEMS Microbiology Ecology 101: 261-270
- Bender M. und Conrad R. (1993)** Kinetics of CH₄ oxidation in oxic soils. Chemosphere 26: 687-696
- Bidlingmeier, W. (2000)** Biologische Abfallverwertung, Ulmer Verlag, Stuttgart.
- Boetius, A., Ravensschlag, K., Schubert, C.J., Rickert, D., Widdel, F., Gieseke, A., Amann, R., Jorgensen, B.B., Witte, U., Pfannkuche, O. (2000)** A marine microbial consortium apparently mediating anaerobic oxidation of methane. Nature 407: 623-626.
- Bonjour, F., Graber, A., Aragno, M. (1988)** Isolation of *Bacillus schlegelii*, a thermophilic hydrogen oxidizing, aerobic autotroph, from geothermal and non-geothermal environments. Microbiology Ecology 16: 331-337.
- Boone, D.R., Mah, R.A. (2001)** Genus I *Methanosarcina*, In: Boone, D.R. Castenholz R.W. (Hrsg.), Bergey's manual of systematic bacteriology, Vol. 1. Springer, New York.
- Bosse U. und Frenzel P. (1997)** Activity and distribution of methane-oxidizing bacteria in flooded rice soil microcosms and in rice plants (*Oryza sativa*). Applied and Environmental Microbiology 4: 119-1207.
- Bottner, P. (1985)** Response of microbial biomass to alternate moist and dry conditions in a soil incubated with ¹⁴C- and ¹⁵N- labelled plant material. Soil Biology and Biochemistry 17: 329-337.
- Bourne, D.G., McDonald, I.R., Murrell, J.C. (2001)** Comparison of *pmoA* PCR primer sets as tools for investigating methanotroph diversity in three Danish soils. Applied and Environmental Microbiology 67: 3802-3809.
- Bratek, S. (2005)** Marburger Entsorgungs-GmbH - Kompostierung mit Gore™ Cover System. Umweltreport Wirtschaftsraum Nord- und Mittelhessen Jahrgang 2005: 62-63.
- Brioukhanov, A., Netrusov, A., Sordel, M., Thauer, R.K., Shima, S. (2000)** Protection of *Methanosarcina barkeri* against oxidative stress: identification and characterization of an iron superoxide dismutase. Archives of Microbiology 174: 213-216.
- Brioukhanov, A., Thauer, R.K., Netrusov, A.I. (2002)** Catalase and superoxide dismutase in the cells of strictly anaerobic microorganisms. Microbiologia 71: 330-335.
- Brochier, C., Gribaldo, S., Zivanovic, Y., Confalonieri, F., Forterre P. (2005)** *Nanoarchaea*: representatives of a novel archaeal phylum or a fast-evolving euryarchaeal lineage related to Thermococcales? Genome Biology 6: R42 (doi: 10.1186/gb-2005-6-5-r42).

- Brosius, J., Dull, T.J., Sleeter, D.D., Noller, H.F. (1981)** Gene organization and primary structure of a ribosomal RNA operon from *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biology* 148: 107-127.
- Burford, J.R., Bremner, J.M (1975)** Relationships between the denitrification capacities of soils and total, water soluble and readily decomposable soil organic matter. *Soil Biology and Biochemistry* 7: 389-394.
- Cahyani, V.R., Matsuya, K., Asakawa, S., Kimura, M. (2004)** Succession and phylogenetic profile of methanogenic archaeal communities during the composting process of rice straw estimated by PCR-DGGE analysis. *Soil Science and Plant Nutrition* 50: 555-563.
- Chaban, B., Ng, S.Y.M., Jarrell, K.F. (2006)** Archaeal habitats – from the extreme to the ordinary. *Canadian Journal of Microbiology* 52: 73-116.
- Chen, A.-C., Imachi, H., Sekiguchi, Y., Ohashi, A., Harada, H. (2003)** Archaeal community compositions at different depths (up to 30 m) of a municipal solid waste landfill in Taiwan as revealed by 16S rDNA cloning analyses. *Biotechnology Letters* 25: 719-724.
- Chin, K.-J., Lukow, T., Conrad, R. (1999)** Effect of temperature on structure and function of the methanogenic archaeal community in an anoxic rice field soil. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 2341-2349.
- Chouari, R., Le Paslier, D., Daengelen, P., Ginestet, P., Weissenbach, J., Sghir, A. (2005)** Novel predominant archaeal and bacterial groups revealed by molecular analysis of an anaerobic sludge digester. *Environmental Microbiology* 7: 1104-1115.
- Cockell, C.S. Reffberg, P. Horneck, G. Patel, M. Lamer, H. Cordoba-Jabanero, C. (2002)** Ultraviolet protection in microhabitats – lessons from the terrestrial poles applied to mars. *Proceedings of the second European workshop on Exo/Astrobiology*, Graz, Österreich.
- 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.
- De Bertoldi, M., Zucconi, F. (1987)** Composting of organic residues, In: Wise, D.L. (Hrsg.), *Bioenvironmental Systems Vol III*. CRC Press Inc., Boca Raton, Florida.
- De Man, J.C. (1983)** MPN-Tables, corrected. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology* 17: 301- 305.
- Derikx, P.J.L., de Jong, G.A.H., Op den Camp, H.J.M., van der Drift, C., van Griesven, L.J.L.D., Vogels, G.D. (1989)** Isolation and characterization of thermophilic methanogenic bacteria from mushroom compost. *FEMS Microbiology Ecology* 62: 251-258.

- Dohrmann, A.B., Tebbe, C.C. (2004)** Microbial community analysis by PCR-single-strand conformation polymorphism (PCR-SSCP), In: Kowalchuk, G.A., De Bruijn, F.J., Head, I.M., Akkermans, A.D.L., Van Elsas, J.D. (Hrsg.), *Molecular Microbial Ecology Manual*- 2nd edition. Kluwer academic publishers, Dordrecht.
- Dojka, M.A., Hugenholtz, P., Haak, S.K., Pace, N.R. (1998)** Microbial diversity in a hydrocarbon- and chlorinated solvent-contaminated aquifer undergoing intrinsic bioremediation. *Applied and Environmental Microbiology* 64: 3869–3877.
- Dunbar, J., Ticknor, L.O., Kuske, C.R. (2000)** Assessment of microbial diversity in four southwestern United States soils by 16S rRNA gene terminal restriction fragment analysis. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 2943–2950.
- Dunfield, P., Knowles, R. (1995)** Kinetics of inhibition of methane by nitrate, nitrite, and ammonium in a humisol. *Applied and Environmental Microbiology* 61: 3129-3135
- Dunfield, P., Conrad, R. (2000)** Starvation alters the apparent half saturation constant for methane in the type II methanotroph methylocystis strain LR1. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 4136-4138.
- Dunfield, P., Yuryef, A., Senin, P., Smirnova, A.V., Stott, M.B., Hou, S., Ly, B., Saw, J.H., Zhou, Z., Ren, Y., Wang, J., Mountain, B.W., Crowe, M.A., Weatherby, T.M., Bodelier, P.L.E., Liesack, W., Feng, L., Wang, L., Alam, M. (2007)** Methane oxidation by an extremely acidophilic bacterium of the phylum Verrucomicrobia. *Nature* 450: 879-882.
- Dunst, G. (1997)** *Kompostierung*, 3. Auflage. Leopold Stocker Verlag, Graz, Österreich.
- Erkel, C., Kemnitz, D., Kube, M., Ricke, P., Chin, K.-J., Svetlana Dedysh, S., Reinhardt, R., Conrad, R., Liesack, W. (2005)** Retrieval of first genome data for rice cluster I methanogens by a combination of cultivation and molecular techniques. *FEMS Microbiology Ecology* 53:187-204.
- Erkel, C., Kube, M., Reinhardt, R., Liesack, W. (2006)** Genome of Rice Cluster I *Archaea* - The Key Methane Producers in the Rice Rhizosphere. *Science* 313: 370-372.
- Fetzer, S., Bak, F., Conrad, R. (1993)** Sensitivity of methanogenic Bacteria from paddy soil to oxygen and desiccation. *FEMS Microbiology Ecology* 12: 107-115.
- Fey, A., Chin, K.J., Conrad R. (2001)** Thermophilic methanogens in Rice field soil. *Environmental Microbiology* 3:295-303.
- Fey, A., Conrad, R. (2003)** Effect of temperature on the rate limiting step in the methanogenic degradation pathway in rice field soil. *Soil Biology and Biochemistry* 35: 1-8.
- Filcheva, E.G., Tsadilas, C.D. (2002)** Influence of clinoptilolite and compost on soil properties. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 33: 595-607.
- Finlay, B.J. (2002)** Global dispersal of free-living microbial species. *Science* 296: 1061-1063.

- Fogarty, A.M., Touvinen, O.H. (1991)** Microbiology degradation of pesticides in yard waste composting. *Microbiological Reviews* 55: 225-233.
- Fracchia, L., Dohrmann, B., Martinotti M.G., Tebbe, C.C. (2006)** Bacterial diversity in a finished compost and vermicompost: differences revealed by cultivation-independent analyses of PCR-amplified 16S rRNA genes. *Applied Microbiology and Biotechnology* 71: 942-952.
- Fritz, J., Link, U., Braun, R. (2001)** Environmental impacts of biobased/biodegradable packaging. *Starch/Stärke* 53: 105-109.
- Garcia, J.L., Patel, B.K.C., Ollivier, B. (2000)** Taxonomic, phylogenetic, and ecological diversity of methanogenic *Archaea*. *Anaerobe* 6: 205-226.
- Garrity, G.M., Holt, J.G. (2001)** Phylum AII *Euryarchaeota*, In: Boone, D.R. Castenholz R.W. (Hrsg.), *Bergey's manual of systematic bacteriology*, Vol. 1. Springer, New York.
- Gattinger, A., Höfle, M.G., Schloter, M., Embacher, A., Böhme, F., Munch, J.C., Labrenz, M. (2007)** Traditional cattle manure application determines abundance, diversity and activity of methanogenic *Archaea* in arable European soil. *Environmental Microbiology* 9: 612-624.
- Godon, J.J., Zumstein, E., Dabert, P., Habouzit, F., Moletta, R. (1997)** Molecular diversity of an anaerobic digester as determined by small-subunit rDNA sequence analysis. *Applied and Environmental Microbiology* 63: 2802-2813.
- Good, I. J. (1953)** The population frequencies of species and the estimation to the population parameters. *Biometrika* 40:237–264.
- Großkopf, R. Janssen, P.H., Liesack, W. (1998a)** Diversity and structure of the methanogenic community in anoxic rice paddy soil microcosms as examined by cultivation and direct 16S rRNA gene sequence retrieval. *Applied and Environmental Microbiology* 64: 960-969.
- Großkopf, R., Stubner, S., Liesack, W. (1998b)** Novel euryarchaeotal lineages detected on rice roots and in the anoxic bulk soil of flooded rice microcosms. *Applied and Environmental Microbiology* 64: 4983-4989.
- Halet, D., Boon, N., Verstraete, W. (2006)** Community dynamics of methanotrophic bacteria during composting of organic matter. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 101: 297-302.
- Hao, X., Chang, C., Larney, F.J., Travis, G. (2001)** Greenhouse Gas Emissions during Cattle Feedlot Manure Composting. *Journal of Environmental Quality* 30: 376-386.
- Haug, R.T. (1993)** *Practical Handbook of compost engineering*. Lewis Publishers, Boca Raton, Florida, USA.
- Hay, J. C., Kuchenrither, R. D. (1990)** Fundamentals and application of windrow composting. *Journal of Environmental Engineering* 116: 746-763.

- He, Y., Inamori, Y., Mizuochi, M., Kong, H., Iwami, N., Sun, T. (2000)** Measurements of N₂O and CH₄ from aerated composting of food waste. *The Science of the Total Environment* 254: 65-74.
- Heijs, S.K., Haese, R.R., van der Wielen, P.W.J.J., Forney, L.J., van Elsas, J.D. (2007)** Use of 16S rRNA Gene Based Clone Libraries to Assess Microbial Communities Potentially Involved in Anaerobic Methane Oxidation in a Mediterranean Cold Seep. *Microbial Ecology* 53: 384-398.
- Hellebrand, H.J. (1998)** Emission of Nitrous Oxide and other Trace Gases during Composting of Grass and Green Waste. *Journal of Agricultural Engineering Research* 69: 365-375.
- Hellmann, B. (1995)** Freisetzung Klimarelevanter Spurengase in Bereichen mit hoher Akkumulation von Biomassen. Zeller Verlag, Osnabrück.
- Hellmann, B., Zelles, L., Palojärvi, A., Bai, Q. (1997)** Emission of Climate-Relevant Trace Gases and Succession of Microbial Communities during Open-Windrow Composting. *Applied and Environmental Microbiology* 63: 1011-1018.
- Herrmann, R.F., Shann, J.F. (1997)** Microbial community changes during the composting of municipal solid waste. *Microbiology Ecology* 33: 78-85.
- Henckel, T., Jäckel, U., Schnell, S., Conrad, R. (2000)** Molecular analyses of novel methanotrophic communities in forest soil that oxidize atmospheric methane. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 1801-1808.
- Hershberger, K.L. Barns, S.M. Reysenbach, A.L. Dawson, S.C. Pace, N.R. (1996)** Wide diversity of *Crenarchaeota*. *Nature* 384: 420.
- Heyer, J. (1990)** Der Kreislauf des Methans. Akademie-Verlag, Berlin.
- Hoitink, H.A.J., Boehm, M.J. (1999)** Biocontrol within the context of soil microbial communities: A substrate-dependent phenomenon. *Annual Reviews of Phytopathology* 37: 427-446.
- Horn, M.A., Matthies, C., Küsel, K., Schramm, A., Drake, H.L. (2003)** Hydrogenotrophic Methanogenesis by Moderately Acid-Tolerant Methanogens of a Methane-Emitting Acidic Peat. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 74-83.
- Huber, H., Hohn, M.J., Rachel, R., Fuchs, T., Wimmer, V.C., Stetter, K.O. (2002)** A new phylum of *Archaea* represented by a nanosized hyperthermophilic symbiont. *Nature* 417: 63-67.
- Hütsch, B.W. (1998)** Methane oxidation in arable soil as inhibited by ammonium, nitrite, and organic manure with respect to soil pH. *Biology and Fertility of Soils* 28: 27-35.
- Innerebner, G., Knapp, B., Vasara, T., Romantschuk, B., Insam, H. (2006)** Traceability of ammonia-oxidizing bacteria in compost-treated soils. *Soil Biology and Biochemistry* 5: 1092-1100.

Insam, H., de Bertoldi, M. (2003) Microbiology of the composting process, In: Golueke, C., Bidlingmeier, W., de bertoldi, M., Diaz, L. (Hrsg.), Compost Science and Technology. Elsevier Science Ltd., Amsterdam, Holland.

Institut für Länderkunde Leipzig (2003) Nationalatlas Bundesrepublik Deutschland. Herbert Liedtke (Hrsg.). Band 2: Relief, Boden und Wasser. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.

IPCC- Intergovernmental Panel on Climate Change (2007) Climate Change 2007: The Physical Science Basis, Summary for Policymakers. 10th Session of Working Group I of the IPCC, Paris, February 2007.

Ishii, K., Fukui, M., Takii S. (2000) Microbial succession during a composting process as evaluated by denaturing gradient gel electrophoresis analysis. *Jornal of Applied Microbiology* 89: 768-777.

Jäckel, U., Schnell, S., Conrad, R. (2001) Effect of moisture, texture and aggregate size of paddy soil on production and consumption of CH₄. *Soil Biology and Biochemistry* 33: 965-971.

Jäckel, U., Thummes, K., Kämpfer, P. (2005) Thermophilic methane production and oxidation in compost. *FEMS Microbiology Ecology* 52: 175-184.

Jeanthon, C. (2000) Molecular ecology of hydrothermal vent microbial communities. *Antonie Van Leeuwenhoek* 77: 117-113.

Jobb, G. (2005) TREEFINDER version of October 2005, Munich, Germany. Distributed by the author at www.treefinder.de.

Kemnitz, D., Chin, K.-J., Bodelier, P., Conrad, R. (2004) Community analysis of methanogenic *Archaea* within a riparian flooding gradient. *Environmental Microbiology* 6: 449-461.

Kemnitz, D., Kolb, S., Conrad, R. (2005) Phenotypic characterization of Rice Cluster III *Archaea* without prior isolation by applying quantitative polymerase chain reaction to an enrichment culture, *Environmental Microbiology* 7: 553-565.

Kiener, A., Leisinger, T. (1983) Oxygen sensitivity of methanogenic Bacteria. *Systematic and Applied Microbiology* 4: 305-312.

Kirby, T.W., Lancaster, J.R., Fridovich, I. (1981) Isolation and characterization of the iron-containing superoxide dismutase of *Methanobacterium bryantii*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 210: 140-148.

Kobayashi, H.A., DeMacario, E.C., Williams, R.S., Macario, A.J.L. (1988) Direct characterization of methanogens in two high-rate anaerobic biological reactors. *Applied and Environmental Microbiology* 54: 693-698.

Kolb, S. (2003) Ein neuer quantitativer Ansatz zur Erfassung der Struktur und Aktivität methanotropher Gilden. Dissertation, Philipps Universität Marburg.

- Kommission Reinhaltung der Luft im VDI und DIN (Hrsg.) (2004)** VDI-Richtlinie 4253 Blatt 2: Erfassung luftgetragener Mikroorganismen und Viren in der Aussenluft – Verfahren zum kulturellen Nachweis der Schimmelpilzkonzentrationen in Luft – indirektes Verfahren nach Probennahme auf Gelatine/Polycarbonatfiltern. VDI-Richtlinie: VDI/DIN-Handbuch Reinhaltung der Luft Band 2.
- Kotsyurbenko, O.R., Chin, K.-J., Glagolev, M.V., Stubner, S., Simankova, M., Nozhevnikova, A.N., Conrad, R. (2004)** Acetoclastic and hydrogenotrophic methane production and methanogenic populations in an acidic West-Siberian peat bog. *Environmental Microbiology* 6: 1159-1173.
- Kreder, C.A. (1995)** Relief of amplification inhibition in PCR with bovine serum albumin or T4 gene 32 protein. *Applied and Environmental Microbiology* 62: 1102-1106.
- Krogmann, U. (1994)** Kompostierung: Grundlagen zur Einsammlung und Behandlung von Bioabfällen unterschiedlicher Zusammensetzung. *Economica Verlag GmbH, Bonn.*
- Krüger, M., Frenzel, P., Conrad, R. (2000)** Microbial process influencing methane emission from rice fields. *Global Change Biology* 6: 1-15.
- Kumar, S., Tamura, K., Nei, M. (2004)** MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Brief Bioinformatics* 5: 150-163.
- La Montagne, M.G., Michel, Jr. F.C., Holden, P.A., Reddy, C.A. (2002)** Evaluation of extraction and purification methods for obtaining PCR-amplifiable DNA from compost for microbial community analysis, *Journal of Microbiological Methods* 49: 255-264.
- Lau, E., Ahmad, A., Steudler, P.A., Cavanaugh, C.M. (2007)** Molecular characterization of methanotrophic communities in forest soils that consume atmospheric methane. *FEMS Microbiology Ecology* 60: 490-500.
- Leadbetter, J.R., Breznak, J.A. (1996)** Physiological ecology of *Methanobrevibacter cuticularis* sp. nov. and *Methanobrevibacter curvatus* sp. nov., isolated from the hindgut of the termite *Reticulitermes flavipes*. *Applied and Environmental Microbiology* 62: 3620-3631.
- Leclerc, M., Delgenes, J.-P., Godon, J.-J. (2004)** Diversity of the archeal community in 44 anaerobic digesters as determined by single strand conformation polymorphism analysis and 16S rDNA sequencing. *Environmental Microbiology* 6: 809-819.
- Levén, L., Eriksson, A.R.B., Schnürer, A. (2007)** Effect of process temperature on bacterial and archaeal communities in two methanogenic bioreactors treating organic household waste. *FEMS Microbiology Ecology* 59: 683-693.
- Lex, S. (2002)** Kompostfibel. Kreisverwaltung Bernkastel-Wittlich, Fachbereich Betrieb Abfallwirtschaft (Hrsg.). Bereitgestellt auf www.bernkastel-wittlich.de.
- Liesack, W., Dunfield, P.F. (2002)** Biodiversity in soils: use of molecular methods for its characterization, In: Bitton, G. (Hrsg.), *Encyclopaedia of Environmental Microbiology*. Wiley and Sons Inc., New York, USA.

- Loferer-Kroeßbacher, M., Klima, J., Psenner, R. (1997)** Determination of bacterial dry mass by transmission electron microscopy and densitometric image analysis. *Applied and Environmental Microbiology* 64: 688-694.
- Lopez-Real, J., Baptista, M. (1996)** A preliminary comparative study of three manure composting systems and their influence on process parameters and methane emissions. *Compost Science and Utilization* 4: 71-82.
- Lott Fischer, J., Albrecht, A., Kämpfer, P. (2001)** Mikrobiologie der Kompostierung von Abfällen, In: Kämpfer, P., Weißenfels, W.D. (Hrsg.), *Biologische Behandlung organischer Abfälle*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
- Lu, Y., Lueders, T., Friedrich, M.W., Conrad, R. (2005)** Detecting active methanogenic populations on rice roots using stable isotope probing. *Environmental Microbiology* 7: 326-336.
- Ludwig, W., Strunk, O., Klugbauer, N., Weizenegger, M., Neumaier, J. (1998)** Bacterial phylogeny based on comparative sequence analysis. *Electrophoresis* 19: 554-568.
- Lueders, T., Chin, K. J., Conrad, R., Friedrich, M. (2001)** Molecular analyses of methyl-coenzyme M reductase alpha-subunit (*mcrA*) genes in rice field soil and enrichment cultures reveal the methanogenic phenotype of a novel archaeal lineage. *Environmental Microbiology* 3: 194-204.
- Lueders, T., Friedrich, M., (2000)** Archaeal Population dynamics during sequential reduction processes in rice field soil. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 2732-2742.
- Macario, A.J.L., DeMacario, E.C. (1988)** Quantitative immunological analysis of the methanogenic flora of digestors reveals a considerable diversity. *Applied and Environmental Microbiology* 56: 79-86.
- Mancinelli, R.L., Klovstad, M. (2000)** Martian soil and UV radiation: microbial viability assessment on spacecraft surfaces. *Planetary and Space Science* 48: 1093-1097.
- Marchant, R., Banat, I.M., Rahman, T.J., Berzano, M. (2002)** The frequency and characteristics of highly thermophilic bacteria in cool soil environments. *Environmental Microbiology* 4: 595-602.
- Martens, C.S., Berner, R.A. (1977)** Interstitial Water Chemistry of Anoxic Long Island Sound Sediments. 1. Dissolved Gases. *Limnology and Oceanography* 22: 10-25.
- Marumoto, T., Kai, H., Yoshida, T., Harada, T. (1977)** Chemical fractions of organic nitrogen in acid hydrolysates given from microbial cells and their cell wall substances and characterization of decomposable soil organic nitrogen due to drying. *Soil Science and Plant Nutrition* 23: 125-134.
- Meile, L., Fischer, K., Leisinger, T. (1995)** Characterization of the superoxide dismutase gene and its upstream region from *Methanobacterium thermoautotrophicum* Marburg. *FEMS Microbiology Letters* 128: 247-253.

- Miller, F. C. (1992)** Composting as a process based on the control of ecologically selective factors. Marcel Dekker Inc., New York.
- Minami, K., Goudriaan, J., Lantinga, E.A., Kimura T. (1993)** Significance of grasslands in emission and absorption of greenhouse gases. In Proc. 17th International Grassland Congress: 1231-1238
- Mladenovska, Z., Ahring, B.K. (1997)** Mixotrophic growth of two thermophilic *Methanosarcina* strains, *Methanosarcina thermophila* TM-1 and *Methanosarcina* sp. SO-2P, on methanol and hydrogen/carbon dioxide. Applied Microbiology and Biotechnology 48: 385-388.
- Mondini, C., Contin, M., Leita, L., De Nobili, M. (2001)** Response of microbial biomass to air-drying and rewetting in soils and compost. Geoderma 105: 111-124.
- Neue, H.U. (1997)** Fluxes of methane from rice fields and potential for mitigation. Soil use manage 13: 258-267.
- Nozhevnikova, A.N., Holliger, C., Ammann, A., Zehnder, A.J.B. (1997)** Methanogenesis in sediments from deep lakes at different temperatures (12-70 °C). Water Science and Technology 36: 57-64.
- Ochsenreiter, T., Selezi, D., Quaiser, A., Bonch-Osmolovskaya, L., Schleper, C. (2003)** Diversity and abundance of crenarchaeota in terrestrial habitats studied by 16S rRNA surveys and real time PCR. Environmental Microbiology 5: 787-797.
- Orphan, V.J., Taylor, L.T., Hafenbradl, D., DeLong, E.F. (2000)** Culture-dependent and culture-independent characterization of microbial assemblages associated with high temperature petroleum reservoirs. Applied and Environmental Microbiology 66: 700-711.
- Orphan, V.J., House, C.H., Hinrichs, K.-U., McKeegan, K.D., DeLong, E.F. (2002)** Multiple archaeal groups mediate methane oxidation in anoxic cold seep sediments. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 99: 7663-7668.
- Pancost, R.D., Sinninghe Damste, J.S., de Lint, S., van der Maarel, M.J.E.C., Gottschal, J.C. (2000)** Biomarker evidence for widespread anaerobic methane oxidation in Mediterranean sediments by a consortium of methanogenic archaea and bacteria. Applied and Environmental Microbiology 66: 1126-1132.
- Perski, H.J., Schoenheit, P., Thauer, R. (1982)** Sodium dependence of methane formation in methanogenic bacteria, FEBS Letters 143: 323-326.
- Peters, S., Koschinsky, S., Schwieger, F., Tebbe, C.C. (2000)** Succession of microbial communities during hot composting as detected by PCR-Single-Strand-Conformation Polymorphism- based genetic profiles of small-subunit rRNA genes. Applied and Environmental Microbiology 66: 930-936.

- Raghoebarsing, A.A., Pol, A., van de Pas-Schoonen, K.T., Smolders, A.J.P., Ettwig, K.F., Rijpstra W.I.C., Schoueten, S., Sinninghe Damste, J.S., Op den Camp, H.J.M., Jetten, M.S.M., Strous, M. (2006)** A microbial consortium couples anaerobic methane oxidation to denitrification. *Nature Letters* 440: 918-921.
- Rahman, T.J., Marchant, R., Banat, I.M. (2004)** Distribution and molecular investigation of highly thermophilic bacteria associated with cool soil environments. *Biochemical Society Transactions* 32: 209-213.
- Ramakrishnan, B., Lueders, T., Dunfield, P., Conrad, R., Friedrich, M.W. (2001)** Archaeal community structures in rice soils from different geographical regions before and after initiation of methane production. *FEMS Microbiology Ecology* 37: 175-186.
- Raskin, L., Stromley, J.M., Rittmann, B.E., Stahl, D.A. (1994)** Group-Specific 16S rRNA Hybridization Probes to describe Natural Communities of Methanogens. *Applied and Environmental Microbiology* 60: 1232-1240.
- Ricke, P., Kube, M., Nakagawa, S., Erkel, C., Reinhardt, R., Liesack, W. (2005)** First Genome data from uncultured upland soil cluster alpha methanotrophs provide further evidence for a close phylogenetic relationship to *Methylocapsa acidiphila* B2 and for high affinity methanotrophy involving particulate methane monooxygenase. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 7472-7482.
- Riddech, N. Klammer, S. Insam, H. (2002)** *Microbiology of composting*, Riddech, N., Klammer, S., Insam, H. (Hrsg.), Springer, Berlin Heidelberg.
- Ros, M., Klammer, B., Knapp, B., Aichberger, K., Insam, H. (2006a)** Long-Term effects of compost amendment of soil on functional and structural diversity and microbial activity. *Soil Use and Management* 22: 209-218.
- Ros, M., Pascual, J.A., Garcia, C., Hernandez, M.T., Insam, H. (2006b)** Hydrolase activities, microbial biomass and bacterial community in a soil after long-term amendment with different composts. *Soil Biology and Biochemistry* 38: 3443-3452.
- Russell, J.B. (1991)** Intracellular pH of acid-tolerant ruminal bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 57: 3383-3384.
- Ryckeboer, J., Mergaert, J., Vaes, K., Klammer, S., De Clercq, D., Coosemans, J., Swings, J. (2003)** A survey of bacteria and fungi occurring during composting and self-heating process. *Annals of Microbiology* 53: 349-410.
- Saison, C., Degrange, V., Oliver, R., Millard, P., Commeaux, C., Montange, D., Le Roux, X. (2005)** Alteration and resilience of soil microbial community following compost amendment: effects of compost level and compost-borne microbial community. *Environmental Microbiology* 8: 247-257.
- Sakai, S., Imachi, H., Sekiguchi, Y., Ohashi, A., Harada, H., Kamagata, Y. (2007)** Isolation of Key Methanogens for Global Methane Emission from Rice Paddy Field: a Novel Isolate Affiliated with a Clone Cluster, the Rice Cluster I. *Applied and Environmental Microbiology* 73: 4326-4331.

- Sambrook, J., Russel, D.W. (2001)** Molecular cloning- a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson A.R. (1977)** DNA sequencing with chain terminating inhibitors. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 74: 5463-5467.
- Scheffer, F., Schachtschabel, P. (1998)** Lehrbuch der Bodenkunde. Enke, Stuttgart.
- Scherer, P. A. (2001)** Mikrobiologie der Vergärung von festen Abfallstoffen, In: Kämpfer, P., Weißenfels, W.D. (Hrsg.), Biologische Behandlung organischer Abfälle. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
- Schlichting, E., Blume, H.P. (1966)** Bodenkundliches Praktikum. Verlag Paul Parey, Hamburg.
- Schnell, S., King, G.M. (1995)** Stability of methane oxidation capacity to variations in methane and nutrient concentrations. FEMS Microbiology Ecology 17: 285-294.
- Schwieger, F., Tebbe, C.C. (1998)** A new approach to utilise PCR-single-strand-conformation polymorphism for 16S rRNA gene-based microbial community analysis. Applied and Environmental Microbiology 64: 4870-4876.
- Seedorf, H., Dreisbach, A., Hedderich, R., Shima, S., Thauer, R.K. (2004)** F₄₂₀H₂ oxidase (FprA) from *Methanobrevibacter arboriphilus*, a coenzyme F₄₂₀-dependent enzyme involved in O₂ detoxification. Archives of Microbiology 182: 126-137.
- Seghers, D., Top, E.M., Reheul, D., Bulcke, R., Boeckx, P., Verstraete, W. Siciliano, S.D (2003)** Long term effects of mineral versus organic fertilizers on activity and structure of the methanotrophic community in agricultural soil. Environmental Microbiology 5: 867-877.
- Seiler, W., Conrad, R., Scharffe, D. (1984)** Field studies of methane emission from termite nests into the atmosphere and measurements of methane uptake by tropical soils. Journal of Atmospheric Chemistry 1: 171-186.
- Sekiguchi, Y., Kamagata, Y., Syutsubo, K., Ohashi, A., Hrada, H., Nakamura, K. (1998)** Phylogenetic diversity of mesophilic and thermophilic granular sludges determined by 16S rRNA gene analysis. Microbiology 144: 2655-2665.
- Shannon, C., Weaver, W. (1949)** The mathematical theory of communication. University of Illinois Press, Urbana.
- Shima, S., Netrusov, A., Sordel, M., Wicke, M. Hartmann, G.C., Thauer, R.K. (1999)** Purification, characterization, and primary structure of a monofunctional catalase from *Methanosarcina barkeri*. Archives of Microbiology: 317-323.
- Shima, S., Sordel-Klippert, M., Brioukhanov, A., Netrusov, A., Linder, D., Thauer, R.K. (2001)** Characterization of a heme-dependent catalase from *Methanobrevibacter arboriphilus*. Applied and Environmental Microbiology 67: 3041-3045.

- Simberloff, D. (1978)** Use of rarefaction and related methods in ecology, In: Dickson, K., L. Cairns, J. J. and Livingston R. J. (Hrsg.), Biological data in water pollution assessment: quantitative and statistical analyses. American Society for Testing and Materials, Philadelphia
- Sommer, S.G., Möller, H.B. (2000)** Emission of greenhouse gases during composting of deep litter from pig production – effect of straw content. *Journal of Agricultural Science* 134: 327-335.
- Stahl, D.A., Amann, R. (1991)** Development and application of nucleic acid probes in bacterial systematics, In: Stackebrandt, E., Goodfellow, M. (Hrsg.), Nucleic acid techniques in bacterial systematics. John Wiley & Sons Ltd., Chichester.
- Stein, L.Y., Jones, G., Alexander, B., Elmund, K., Wright-Jones, C., Nealson, K.H. (2002)** Intriguing microbial diversity associated with metal-rich particles from a freshwater reservoir. *FEMS Microbiology Ecology* 42: 431-440.
- Stentiford, E.I. (1996)** Composting Control: Principles and Practice, In: DeBertoldi, M., Sequi, P., Lemmes, B., Papi, T. (Hrsg.), The Science of Composting. Blackie Academic and Professional, London.
- Stuedler, P.A., Bowden, R.D., Melillo, J.M., Aber J.D. (1989)** Influence of nitrogen fertilization on methane uptake in temperate forest soils. *Nature* 341: 314-316
- Striegl, R.G., McConnaughey, T.A., Thorstenson, D.C., Weeks, E.P., Woodward J.C. (1992)** Consumption of atmospheric methane by desert soils. *Nature* 357: 145-147
- Sukesan, S., Watwood, M.E. (1998)** Effects of hydrocarbon enrichment on trichloroethylene biodegradation and microbial populations in finishes compost. *Applied Microbiology* 85: 635-642.
- Tebbe, C., Vahjen, W. (1993)** Interference of humic acids and DNA extracted directly from soil in detection and transformation of recombinant DNA from Bacteria and a Yeast. *Applied and Environmental Microbiology* 59: 2657-2665.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson T.J. (1994)** CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic acid Research* 22: 4673-4680.
- Thummes, K., Kämpfer, P., Jäckel, U. (2007a)** Temporal change of composition and potential activity of the thermophilic archaeal community during the composting of organic material. *Systematic and Applied Microbiology* 30: 418-429.
- Thummes, K., Schäfer, J., Kämpfer, P., Jäckel, U. (2007b)** Thermophilic methanogenic *Archaea* in compost material: Occurrence, persistence and possible mechanisms for their distribution to other environments. *Systematic and Applied Microbiology* 30: 634-643.
- Ueki, A., Ono, K., Tsuchiya, A., Ueki, K. (1997)** Survival of methanogens in air-dried paddy field soil and their heat tolerance. *Water Science and Technology* 36: 517-522.

- Valentine, D.L., Reeburgh, W.S. (2000)** New perspectives on anaerobic methane oxidation. *Microbial Ecology* 2: 477-484.
- Wagner, D., Pfeiffer, E.M., Bock, E. (1999)** Methane production in aerated marshland and model soils: effects of microflora and soil texture. *Soil Microbiology and Biochemistry* 31: 999-1006.
- Weiland, P. (2001)** Verfahrenstechnik der anaeroben Behandlung organischer Abfälle, In: Kämpfer, P., Weißenfels, W.D. (Hrsg.), *Biologische Behandlung organischer Abfälle*. Springer, Berlin-Heidelberg.
- Whitaker, R.J., Grogan, D.W., Taylor, J.W. (2003)** Geographic barriers isolate endemic populations of hyperthermophilic *Archaea*. *Science* 301: 976-978.
- Widdel, F., Bak, F. (1992)** Gram-negative mesophilic sulfate-reducing bacteria, -In: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H., Stackebrandt, E. (Hrsg.), *The prokaryotes*. Springer-Verlag, New York.
- Wiegel, J. (1990)** Temperature spans for growth: hypothesis and discussion. *FEMS Microbiology Reviews* 75: 155-170.
- Wiemer, K., Kern, M. (1993)** *Biologische Abfallbehandlung*. M.I.C. Baeza Verlag, Witzhausen.
- Winkler, J. (2004)** Liste aller bisher erschienenen, den Boden als Pflanzenstandort betreffenden Ö-Normen. *Mitteilungen der Österreichischen Bodenkundlichen Gesellschaft*, 71: 328-332, aktualisiert April 2005.
- WMO- World Meteorological Organisation (1999)** *Scientific Assessment of Ozone Depletion: 1998. Global ozone and Research and monitoring project report 44*, Genf, Schweiz.
- Woese, C.R., Kandler, O., Wheelis, M.L. (1990)** Towards a natural system of organisms: Proposal for the domains *Archaea*, *Bacteria*, and *Eucarya*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United USA* 87: 4576-4579.
- Woese, C., Fox, G.E. (1977)** Phylogenetic structure of the Prokaryotic Domain: the primary kingdoms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United USA* 74: 5088-5090.
- Wolkenhauer, C. (2003)** *Landnutzungsvergleich Namibia*. Diplomarbeit am Institut für Allgemeine Botanik der Universität Hamburg.
- Wu, X.L., Friedrich, M.W., Conrad, R. (2005)** Diversity and ubiquity of thermophilic methanogenic *Archaea* in temperate anoxic soils. *Environmental Microbiology* 8: 394-404.
- Wuebbles, D.J., Hayhoe, K. (2000)** Atmospheric Methane: Trends and Impacts, In: Van Ham, J., Baede, A.P.M., Meyer, L.A., Ybema, R. (Hrsg.), *Non-CO₂ Greenhouse Gases: Scientific Understanding, Control and Implementation*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Holland.

Yao, H., Conrad, R. (2000) Effect of temperature on reduction of iron and production of carbon dioxide and methane in anoxic wetland rice soils. *Biology and Fertility of Soils* 30: 135-141.

Yang, S.-S., Chang, H.-L. (1998) Effect of environmental conditions on methane production and emission from paddy soil. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 69: 69–80.

Zellner, G. (2001) Genus I *Methanomicrobium*, In: Boone, D.R. Castenholz R.W. (Hrsg.), *Bergey's manual of systematic bacteriology*, Vol. 1. Springer, New York.

7 Internetquellen

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/> (Januar 2005 bis Juni 2007)

<http://www.dsmz.de/> (Januar 2005 bis März 2008)

<http://www.kompost.de/> (Januar 2005 bis August 2007)

<http://www.treefinder.de/> (März 2006)

<http://rrndb.cme.edu/rrndb/servlet/controller> (Juni 2006)

<http://mica.ibest.uidaho.edu/trflp.php> (Juni 2006)

<http://rdp8.cme.msu.edu/html/index.html> (Juni 2006)

<http://www.uga.edu/~strata/software/index-html> (Oktober 2006)

<http://insilico.ehu.es/restriction/> (Januar 2007)

<http://www.bmu.de> (August 2007)

<http://www.kompost.de/> (August 2007)

<http://wetter.rtl.de/> (Januar 2008)

Anhang A

Available online at www.sciencedirect.com

Systematic and Applied Microbiology 30 (2007) 418–429

**SYSTEMATIC AND
APPLIED MICROBIOLOGY**

www.elsevier.de/syapm

Temporal change of composition and potential activity of the thermophilic archaeal community during the composting of organic material

Kathrin Thummes^a, Peter Kämpfer^a, Udo Jäckel^{a,b,*}^aInstitut für Angewandte Mikrobiologie, Justus-Liebig-Universität Giessen, Heinrich-Buff-Ring 26-32, D-35392 Giessen, Germany^bBundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin, Nöldnerstraße 40-42, D-10317 Berlin, Germany

Received 11 October 2006

Abstract

To date, composting has been regarded as an aerobic process but it has been shown that composting piles are often sources of atmospheric methane. In order to gain a more comprehensive view on the diversity of methanogenic *Archaea* in compost, gas chromatographical methods and molecular cloning were used to study relationships of thermophilic archaeal communities and changes in methane production potential during compost maturation. According to the thermophilic methane production potential, wide differences could be detected between differently aged compost materials. In material derived from 3- and 4-week-old piles, low and no thermophilic methane production potential, respectively, was observed at 50 °C. Material from a 6-week-old pile showed the maximum methane production. With compost maturation, the production slowly decreased again with 6 weeks, 8 weeks, and mature compost showing an optimum methane production potential at 60 °C. At 70 °C, only 6-week-old material showed a comparable high production of methane. The 16S rRNA-based phylogenetic surveys revealed an increase of archaeal diversity with compost maturation. In the 6-week-old material, 86% of the sequences in the archaeal 16S rRNA library had the highest sequence similarities to *Methanothermobacter* spp. and the remaining 14% of the clones were related to *Methanosarcina thermophila*. Quantification of methanogens in 6-week-old material, on the basis of the methane production rate, resulted in values of about 2×10^7 cells per gram fresh weight. In 8-week-old and mature compost material, the proportion of sequences similar to *Methanothermobacter* spp. decreased to 34% and 0%, respectively. The mature compost material showed the highest variation in identified sequences, although 33% could be assigned to as yet uncultured *Archaea* (e.g. Rice cluster I, III, and IV). Our results indicate that compost harbours a diverse community of thermophilic methanogens, with changing composition during the maturation process, presumably due to altered pile conditions. Likewise, compost may act as a potential carrier for thermophilic methanogens in temperate soils because it is widely used as a soil amendment.

© 2007 Elsevier GmbH. All rights reserved.

Keywords: Compost; Thermophilic methane production; *Archaea*; *Methanothermobacter thermoautotrophicus*; *Methanosarcina thermophila*; Rice cluster

*Corresponding author. Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin, Nöldnerstraße 40-42, D-10317 Berlin, Germany. Tel.: +49 641 99 37352; fax: +49 641 99 37359.

E-mail address: jaeckel.Udo@baua.bund.de (U. Jäckel).

Introduction

The composting process is primarily regarded as a waste management method to stabilise organic waste

such as manure, yard trimmings, municipal loppings, or organic urban wastes. At present, more than 600 full-scale composting plants are producing nearly 3.5 million tons of compost in Germany (Bundesgütegemeinschaft Kompost: <http://www.bgkev.de>) with the aim of residual waste reduction. The stabilised final product is widely used as a soil amendment to improve soil structure, to provide plant nutrients, and to facilitate the regeneration of the natural cover of disturbed or eroded soil [11,15,31].

A typical composting process goes through a series of temperature stages. Due to the intensive microbial activity in combination with the rather low thermal conductivity of the material, which is between 0.05 and $0.35 \text{ W m}^{-1} \text{ K}^{-1}$ (depending on the water content; [6]), the temperature generally raises dramatically up to $80 \text{ }^\circ\text{C}$ [12,53]. These high temperatures are maintained by periodic turning or controlled aeration of compost heaps, leading to constant microbial activity. After the easily degradable compounds have been metabolised, the temperature decreases because of the decrease of metabolic activity and because temperature irradiation of the heaps has surpassed the heat production [49].

Basically, composting is regarded as an engineered process, biologically conducted by aerobic microorganisms. Therefore, it has been proposed that composting of organic waste can reduce the unregulated anaerobic degradation of organic wastes in landfills [3,20]. However, it has also been proven that compost piles can act as sources for anaerobically formed atmospheric methane [4,26,27].

Methane emissions from compost facilities are influenced by the heap dimension [4], the heap density [68], the input material [25], and, as recently shown, by the methanotrophic activity [37]. On the basis of a restricted data set, methane emissions from compost facilities in Germany have been estimated to be $7.4 \times 10^6 \text{ t CH}_4 \text{ a}^{-1}$, corresponding to 0.31–0.44% of the total methane emission in Germany [27].

To date, the processes and microorganisms leading to methane production in this environment have not been studied in detail. Derikx et al. [14] studied the methane production during the thermophilic stage of compost processing. They isolated and identified *Methanobacterium thermoautotrophicum* as one of the predominant *Archaea* in compost. Hellmann et al. [28] showed, via phospholipid fatty acid (PLFA) analysis, that the increase of methane production under thermophilic conditions was accompanied by a simultaneous increase of ether lipid concentrations, which are exclusively located in *Archaea*. In contrast, Cahyani et al. [7] investigated the succession of the archaeal community during the composting process of rice straw by DGGE analysis, and they supposed that no thermophilic methanogens grow during the thermophilic stage of composting.

Therefore, this current study investigated the archaeal 16S rRNA gene composition in compost materials at different stages by a cloning approach in order to examine the methanogenic population, and to analyse factors mediating changes in the archaeal communities during compost maturation.

Materials and methods

Plant description

The studied composting plant was located in Hesse in Central Germany and was supervised by a local operating company. It works according to the open windrow composting system. The average material turnover of the plant is approximately 10,000 t organic waste per year, consisting of about 70% organic material from communal bio-waste collection (catchment area about 77,000 inhabitants) and 30% loppings (from tree-cutting), and grass. To produce a homogeneous composition of input material, selected amounts of hogged green wastes and bio-wastes are mixed and shredded before the trapezoid piles are set up. For the initial 3 weeks, the composting process is carried out under a Gore-tex[®] membrane. The oxygen supply for microorganisms is ensured via ventilation during this phase. After this initial phase, the piles are set up as trapezoid-shaped piles without a covering (dimension: 30 m length, 3 m width and 1.8 m height). These piles are turned once to twice per week. The mature compost is sieved (0–20 mm) after 9–13 weeks of processing. Rough-textured material is recycled and transferred to the input material of a new composting process.

Compost sampling

To get a representative sample of each investigated compost pile (6-, 8-week-old, and a mature compost (10 mm sieved) heap), three sampling points per heap were selected, one in the centre and one at both ends, each with a depth of 20 cm. About 500 g of compost material was collected from each of the three points. These three samples were pooled, mixed, and sieved over 4 mm in the laboratory. Thus, one mixed sample per heap was obtained. These samples were used for all the studies described below.

Water-holding capacity and gravimetric water content

The maximal water-holding capacity (mWHC) of the compost material was determined by the method of Schlichting and Blume [65].

The compost material was filled in a plastic cylinder (diameter 3 cm; height 6 cm) which was closed at the bottom with a filter paper and a nylon tissue. The plastic cylinder was placed in a water-filled beaker and the water level was regulated to 3 mm over the compost surface, but under the level of the plastic cylinder, to avoid water inflow. After soaking the compost for 24 h, the material was drained for 1 h standing on a water-saturated filter paper. Subsequently, 5 g of the wet material was weighed into an aluminium cup and the gravimetric water content was determined according to Eq. (1):

$$\text{GW (\%)} = (\text{FW} - \text{DW})/\text{DW} \times 100, \quad (1)$$

where FW is the mass of wet compost material (~4 g) and DW is the mass of the material dried at 105 °C overnight. The gravimetric water content of these water-saturated samples was assumed as the mWHC.

The GW of the original compost materials was determined exactly as described above and was expressed as a percentage of the mWHC.

Potential methane production

To measure the potential methane production of the compost material, 4 g (fresh weight) aliquots of a mixed sample (see above) were incubated under N₂ atmosphere in sterile 120 ml serum bottles closed with butyl stoppers. After 1 day of pre-incubation at 50 °C in the dark, the atmosphere was flushed again with N₂. During a further incubation at 50 °C, the methane production measurements were undertaken as described previously [37].

To investigate optimum temperature for methane production in 6-, 8-week-old, and mature compost material, the second incubation step was carried out in triplicate at 36, 45, 50, 60, and 70 °C, respectively.

To determine the influence of the water content of the compost on the potential methane production, material from a 6-week-old pile was pre-incubated at 50 °C, as specified above. After 24 h of pre-incubation, different water contents were adjusted. To two series of triplicates, 2 and 6 ml anoxic water (flushed for 15 min with N₂) was added, respectively. One series was flushed with N₂ until a reduction of weight to 0.5–1.0 g was observed, whereas the other triplicates remained untreated. The atmosphere of all bottles was flushed again with N₂, and after 4 days of incubation at 50 °C, the accumulated methane was analysed as specified above. Finally, the gravimetric water contents of the different samples were determined and expressed as a percentage of the previously analysed mWHC (see above).

pH measurement

A total of 2 g of the collected compost material was weighed into a Falcon tube (Greiner, Nuertingen, Germany) and mixed with 20 ml of a 0.01 M CaCl₂ solution. Subsequently, the tubes were shaken vertically (Titramax 100, Heidolph, Schwabach, Germany) for 1 h. After sedimentation of the solid particles (approx. 30 min), the pH measurement was performed in the supernatant with a pH-temperature single-rod measuring cell (Microprocessor pH535, Multical, Weilheim, Germany).

Extraction of total community DNA from compost material

The total community DNA was extracted directly from 0.5 g fresh compost material using the FastDNA[®] Spin[®] Kit for soil (BIO101 systems, MP-Biomedical, Solon, OH), according to the protocol provided by the manufacturer.

PCR of 16S rRNA gene fragments

Due to unspecific PCR products at the beginning of the experiments, it was decided to perform a touchdown PCR for the amplification of archaeal and bacterial 16S rRNA gene fragments. To minimise the inhibition of co-extracted humic acids on the amplification [72], BSA was added to the PCR-reaction mixture [45]. With the applied composition of reaction mixture and the cycle conditions (see below), a specific amplification product was always obtained, and thus the following PCR conditions were used as a basis for all molecular experiments.

For the amplification of archaeal 16S rRNA, the A112f/A934b primer system was used (Table 1, MWG Biotech, Ebersberg, Germany). Each PCR was performed in a total volume of 25 µl. Reaction mixture contained 2.5 µl 1 × PCR buffer, 3 µl MgCl₂ (25 mM), 2.5 µl dNTPs (2 mM), each primer 0.5 µl (25 µM, MWG Biotech, Ebersberg, Germany), 16 µl RNase- and DNase-free water (Invitrogen, Carlsbad, CA), 0.08 µl BSA (20 mg ml⁻¹), 0.1 µl Taq polymerase (5 U µl⁻¹) (all MBI Fermentas, St. Leon Rot), and 1 µl of diluted compost community DNA extract (1:10 with RNase- and DNase-free water). Touchdown PCR was carried out in a Thermocycler (MyCycler[™], BioRad, München, Germany) with an initial denaturation step at 94 °C for 4 min, followed by 20 cycles of a succession of denaturation (94 °C for 45 s), annealing (for 45 s: first cycle at 65 °C, a decrease of 0.5 °C up to 55 °C for every further repeat) and extension (72 °C for 2 min), with a further 10 cycles of a succession of denaturation at 94 °C for 45 s, annealing at 55 °C for 45 s and extension for

Table 1. Oligonucleotide primers used in this study for PCR and sequencing of partial archaeal 16S rRNA genes

Oligonucleotide	Sequence (5'–3')	Use	Reference
A934b	GTGCTCCCCGCCAATTCCT	PCR amplification	[69]
A112f	GCTCAGTAACACGTGG	PCR amplification	[23]
Com1f	CAGCAGCCGCGTAATAC	MPN-PCR amplification	[66]
Com2r	CCGTCAATTCCTTTGAGTTT	MPN-PCR amplification	[66]
M13f	GTAAAAGGACGGCCAG	Sequencing	Invitrogen (Carlsbad, CA)
M13r	CAGGAAACAGCTATGAC	Sequencing	Invitrogen (Carlsbad, CA)

2 min at 72 °C, completed with a terminal extension step for 20 min at 72 °C. PCR products were purified (PCR Purification Kit 250, QiaQuick[®], Quiagen, Hilden) and visualised on an ethidium bromide stained 1.7% agarose gel.

Cloning and RFLP of 16S rRNA gene fragments

For the cloning analyses, the TOPO TA Cloning[®] Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA) was used. The cloning was performed according to the details given by the manufacturer. For 6-, 8-week-old, and mature compost material a total of 43, 41, and 43 clones were analysed, respectively. The presence of inserts was confirmed by PCR with the A112f/A934b primer system (Table 1). The positive 16S rRNA-clone amplicons were used for RFLP analysis with endonucleases *Hha I* and *Bsu RI* (MBI Fermentas, St. Leon Rot). The enzymatic digestions were performed in two separate reactions. For each reaction, 6 µl of PCR product was digested with a mixture of 0.1 µl enzyme (10 U µl), 11.9 µl RNase- and DNase-free water (Invitrogen, Carlsbad, CA), and 2 µl of the enzyme specific buffer (all MBI Fermentas, St. Leon Rot) for 4 h at 37 °C. The total volume was analysed over a 3% agarose gel. Different operational taxonomic units (OTUs) were evaluated visually. Corresponding clones were cultivated overnight in liquid LB media and centrifuged. The pellets were used for plasmid extraction with alkaline lysis [64]. Plasmids were diluted and sequenced with the AbiPrism[®] BigDye[™] Primer Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Weiterstadt) by using the primers M13f and M13r (Table 1, Invitrogen, Carlsbad, CA). Diversity of the clone libraries was further investigated by rarefaction analysis. Calculations were carried out on a personal computer using the freeware programme Analytic Rarefaction (Version 1.3, <http://www.uga.edu/~strata/software/index.html>).

Phylogenetic analysis

Phylogenetic analysis of sequence data was conducted using MEGA version 3.1 [46]. In a first step, a BLAST

search (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) was performed, in order to ensure the correct phylogenetic placement of the obtained SSU rRNA gene sequences. With a selection of the closest BLAST matches, a multiple alignment was undertaken by ClustalW. A calculation of evolutionary distances between the pairs of sequences was made, and phylogenetic trees were constructed by the neighbour-joining or maximum parsimony method, both included in the MEGA version 3.1. In case of tree construction by maximum likelihood, Treefinder (www.treefinder.de; [40]) software was used.

These sequence data have been submitted to the EMBL database under the accession numbers AM418679–AM418706.

Most probable number (MPN)-PCR analysis

MPN-PCR is a simple approach for obtaining a rough estimation of the number of specific 16S rRNA gene fragments in a sample [32]. To determine the archaeal abundance in comparison to the abundance of *Bacteria*, we performed three-tube MPN-PCR as follows. Serial 10-fold dilutions were prepared for the total community DNA extract (RNase- and DNase-free water, Invitrogen, Carlsbad, CA), and 1 µl of this diluted DNA was used as a template in the MPN-PCR. For estimations of the numbers of *Bacteria*, 16S rRNA gene fragments were amplified with the COM 1F/COM 2R primer system (Table 1, MWG Biotech, Ebersberg, Germany). Reaction mixture contained 2.5 µl 1 × PCR-buffer, 2.0 µl MgCl₂ (25 mM), 2.5 µl dNTPs (2 mM), each primer 0.3 µl (25 µM, MWG Biotech, Ebersberg, Germany), 17.4 µl RNase- and DNase-free water (Invitrogen, Carlsbad, CA), 0.08 µl BSA (20 mg ml⁻¹), 0.1 µl Taq polymerase (5 U µl⁻¹) (all MBI Fermentas, St. Leon Rot), and 1 µl of diluted DNA extract. Cycle conditions were as follows: initial denaturation at 95 °C for 3 min, 20 cycles of a succession of denaturation (94 °C for 45 s), annealing (for 45 s: first cycle at 65 °C, for every further repeat a decrease of 0.5 °C down to 55 °C), and extension (72 °C for 45 s), followed by 5 cycles of denaturation at 94 °C for 45 s, annealing for 45 s at 55 °C and extension for 45 s at 72 °C, and final

completion with a terminal elongation for 7 min at 72 °C.

For estimating the numbers of *Archaea* via the number of 16S rRNA gene fragments, PCR was carried out by using the A112f/A934b primer system (Table 1) as specified above.

The highest dilution that yielded PCR products was noted. For interpretation, a standard three-tube MPN chart [13] was consulted in order to calculate the number of genes. For calculating cell numbers, a mean bacterial rRNA operon number of 3.6 [57] and a mean archaeal rRNA operon number of 2.5 (<http://rrndb.cme.edu/rrndb/servlet/controller>) were assumed.

Results

Influence of age, pH, water content and temperature of compost on potential methane production

Compost materials of different processing ages were investigated and the methane production potential was shown to follow a regular temporal sequence. In material younger than 5 weeks, low or no methane production potential was detectable. Maximum methane production could always be observed in material from 6-week-old heaps, with up to 36 $\mu\text{mol CH}_4$ per gram dry weight per day (data not shown). Material older than 6 weeks showed a decreasing methane production potential with an increase in compost maturity (Fig. 1).

Simultaneously, water content and pH value were determined in these samples, as shown in Fig. 1. The increase of the methane production potential in heaps

with an age of 4 and 5 weeks, respectively, was accompanied by a clear increase in pH from 5.8 to 7.6. In contrast, the water content clearly decreased from 61% to 34% mWHC in heap material between 4- and 5-week-old (Fig. 1). During further maturation, the water content was more or less constant between 26% and 34% mWHC.

At 50 °C, the potential methane production of 6-week-old material clearly increased when the water content was raised from 20% up to 60% mWHC. A further increase of the water content did not change the methane production potential considerably (Fig. 2).

For all analysed materials, the optimum temperature for methane production was at 60 °C (Fig. 3). At 70 °C, the methane production in the 6-week-old material was nearly as high as at 60 °C, whereas in the 8-week-old

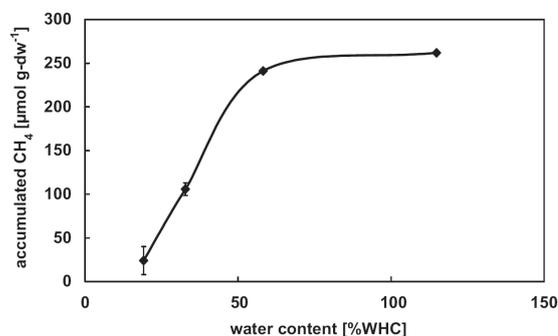


Fig. 2. Accumulated methane as a function of compost moisture. Methane concentration was measured after 4 days incubation at 50 °C. The investigated compost material had a processing age of 6 weeks. Values are means of duplicates \pm SD.

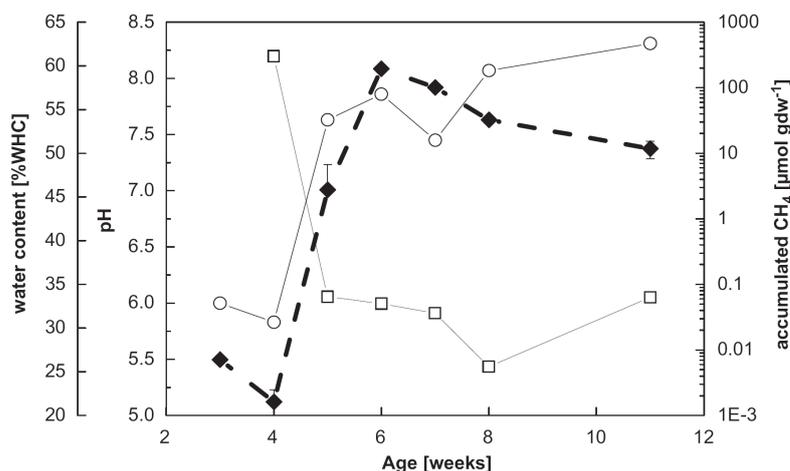


Fig. 1. Accumulated methane (\blacklozenge), pH values (\circ), and water content (\square) of material with different ages. The amount of accumulated CH₄ was measured after 5 d of incubation at 50 °C. Values are means of triplicates \pm SD whereas the values for pH and water content result from the relevant specifications.

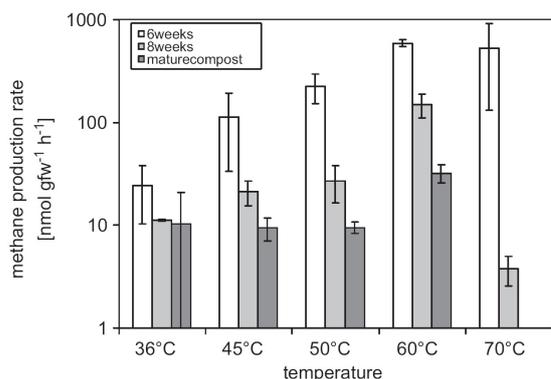


Fig. 3. Potential methane production rates of 6- and 8-week-old and of mature compost material as a function of incubation temperature. The methane production rates are means of triplicates \pm SD.

material and mature compost almost no activity was detectable at 70 °C (Fig. 3).

The in situ temperatures at the three sampling points (depth 20 cm) in each of the sampled heaps ranged between 62 and 64.5 °C for the 6-week-old pile, 61.5 and 62 °C in the 8-week-old pile, and 50 and 52.3 °C in the mature pile.

Archaeal community and rarefaction analysis

In order to notice a possible shift in the methanogenic community during compost maturation, the composition of archaeal 16S rRNA genes was analysed by cloning analyses in 6-, 8-week-old, and mature compost material. After RFLP fingerprinting and a subsequent sequence analysis of the clones, different OTUs were evaluated. A sequence similarity of $\geq 98\%$ between the clones was defined as the level for species and OTU separation.

In total, 86% of the clones from the 6-week-old material belonged to one OTU. They showed the highest sequence similarity (99%) to species of the genus *Methanothermobacter* (Figs. 4 and 5). In contrast, this OTU was less abundant in 8-week (34%) old material and not detectable in the mature compost.

The dominant OTU (66%) in the 8-week-old compost material showed 98% sequence similarity to *Methanosarcina thermophila* (Figs. 4 and 5). The corresponding OTU in the mature and the 6-week-old compost material accounted for 56% and 14% of the clones, respectively. Altogether these OTUs were found in all three materials (Fig. 4).

In the mature compost material, 11.6% of the clone sequences belonged to an OTU showing the highest sequence similarity to *Methanobacterium formicicum*. A

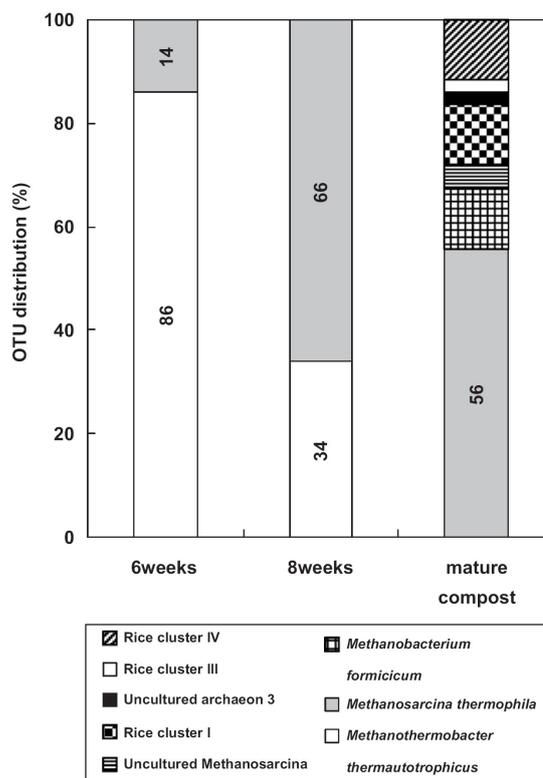


Fig. 4. Allocation of the archaeal clones in 6, 8 weeks, and mature compost material, and frequency of their appearance as a percentage of the total number of analysed clones (6 weeks $n = 43$; 8 weeks $n = 41$; mature compost $n = 43$).

further 11.6% of the clones could be assigned to another OTU, which represented members of the euryarchaeotal Rice cluster I. The same percentage of analysed clones belonged to an OTU most similar to members of the deep-branching uncultured crenarchaeotal Rice cluster IV. Phylogenetic analyses showed that the sequences obtained from waste treatment plants formed a separate cluster within Rice cluster IV ("WTP-Cluster", Fig. 5; compost: KT32, KT33, KT38, KT25 – this study; anaerobic digester: 058C07, 059C03, 059A07 – [10]; 65C, 71C – Hougaard and Westermann, unpublished). The dendrogram shown in Fig. 5 was calculated using the neighbour-joining method. Phylogenetic trees calculated with the maximum parsimony and the maximum likelihood method, respectively, confirmed this separation (data not shown).

Of the remaining 9.2% of OTUs, one could be assigned to Rice cluster III (2.3%), and two (4.7% and 2.3%) showed sequence similarity to uncultured *Methanosarcina* sequences (Fig. 4, uncultured archaeon 3, uncultured *Methanosarcina*).

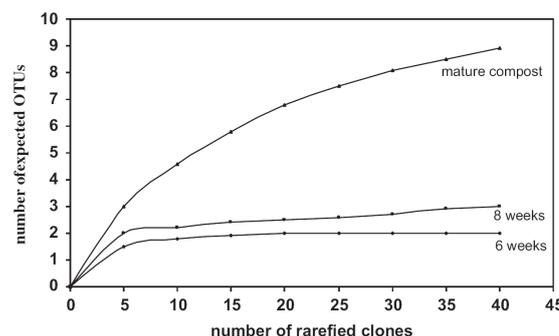
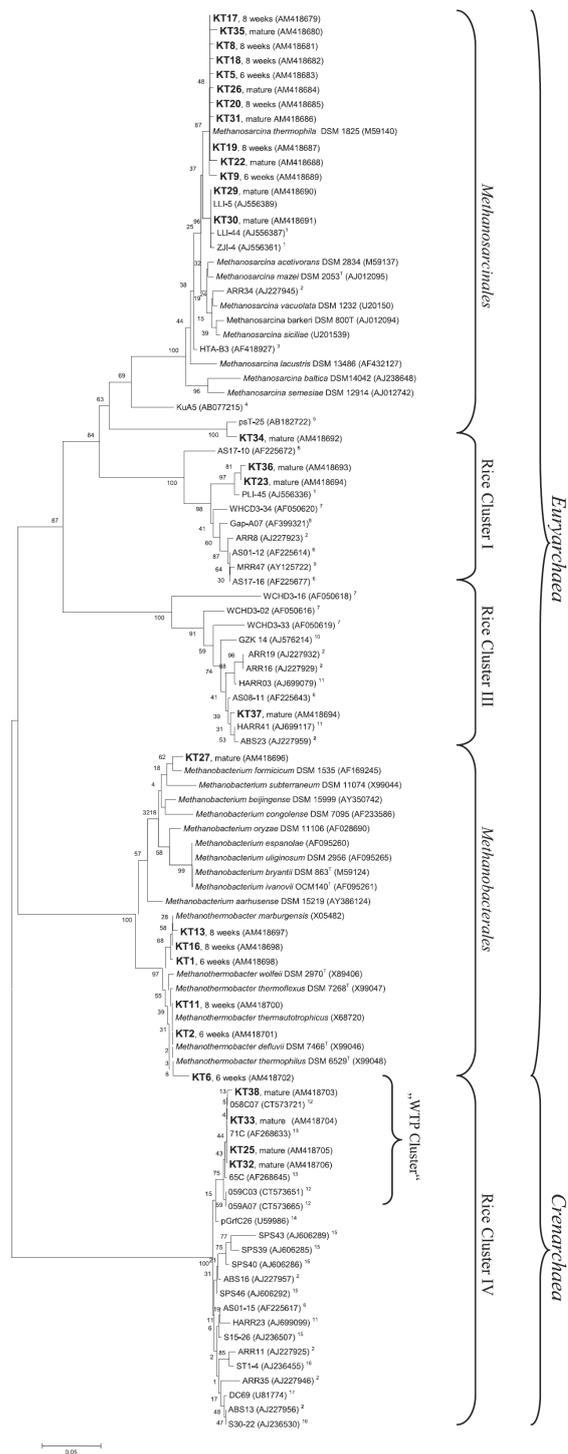


Fig. 6. Rarefaction curves for the different RFLP of 16S rRNA gene fragment patterns (OTUs) representing expected diversity of 16S rRNA clones of 6-, 8-week-old, and mature compost. Rarefaction curves were calculated using the free-ware programme Analytic Rarefaction (version 1.3, <http://www.uga.edu/~strata/software/index.html>).

Rarefaction analysis evaluated statistically whether screening of these clones was sufficient to estimate the total diversity within each sample. For clone libraries of the 6-week-old material and of the 8-week-old material (Fig. 6), the analyses of 43 and 41 clones, respectively, were sufficient to detect the majority of species. The rarefaction curve for the clone library of the mature material did not approach saturation. In this case, an increasing number of clones would have revealed further diversity (Fig. 6).

In total, four OTUs from all generated clones ($n = 127$) could not be assigned to any archaeal

Fig. 5. Phylogenetic tree showing the position of 16S rRNA clone sequences recovered from 6-, 8-week-old, and mature compost material (KT clones) within the domain of Archaea. This tree was constructed by the neighbour-joining method. The numbers at the nodes indicate the percentage recovery in 1000 bootstrap resamplings. The scale bar corresponds to a 5% estimated difference in the nucleotide sequence positions.

- ¹ZJI-4, LLI-44, LLI-5, PLI-45: rice field soil after adaptation to 45 °C [76].
- ²ARR34, ARR19, ARR16, ARR8, ARR11, ARR35: rice roots; ABS23, ABS16, ABS13: anoxic rice bulk soil [24].
- ³HTA-B3: fresh water reservoir [70].
- ⁴KuA5: cavity groundwater [73].
- ⁵psT-25: flooded rice paddy soil (Liu et al., unpublished).
- ⁶AS17-16, AS01-12, AS17-10, AS01-15: rice field soil [51].
- ⁷WHCD3-16, WHCD3-02, WHCD3-33, WHCD3-34: contaminated aquifer [16].
- ⁸Gap-A07: rice field soil [61].
- ⁹MRR47: rice roots (Chin et al., unpublished).
- ¹⁰GZK 14: landfill leachate [34].
- ¹¹HARR03, HARR41, HARR23: rice roots [50].
- ¹²058C07, 059C03, 059A07: anaerobic sludge digester [10].
- ¹³71C, 65C: anaerobic sludge digester (Hougaard and Westermann, unpublished).
- ¹⁴pGrfC26: shallow sediment [30].
- ¹⁵SPS43, SPS39, SPS40, SPS46: acidic peat bog [44].
- ¹⁶S30-22, S15-26, ST1-4: rice field soil [9].
- ¹⁷DC69: anaerobic sludge [22].

organism but to *Streptomyces* sp. (94% sequence similarity), hyperthermophilic *Bacteria*, *Geobacillus debilis* and *Thermoactinomyces* sp. (each with 99% sequence similarity, data not shown), which are also known as inhabitants of compost [36]. These results demonstrate that the A112f/A934b primer system can also generate low amounts (<4%) of PCR products distinct from archaeal 16S rRNA genes.

Quantification of methanogens in the 6-week-old material by the methane production rate ($0.59 \mu\text{mol g}^{-1} \text{fw}^{-1} \text{h}^{-1}$) resulted in values of about 6×10^7 methanogens $\text{g}^{-1} \text{dw}$. This calculation assumed a V_{max} per mg and cell (e.g. *Mtb. thermoautotrophicus*) of approximately $2 (1\text{--}3.2) \mu\text{mol CH}_4 \text{min}^{-1}$ [59] and a cell weight of 500fg (transferred from *E. coli* with $20\text{--}1000 \text{mg cell}^{-1}$; [48]). Using the MPN-PCR, similar numbers of $0.2\text{--}4 \times 10^7$ cells $\text{g}^{-1} \text{dw}$ were determined for *Archaea*. For *Bacteria*, cell numbers of 10^{11} cells $\text{g}^{-1} \text{dw}$ were detected by the same method.

Discussion

In this study, the population shift and potential activity of the archaeal community during the composting process of organic material was investigated.

The results presented here are in agreement with those of Derikx et al. [14] and Hellmann et al. [28] who provided evidence for the existence and activity of methanogenic microorganisms at the thermophilic stage of a composting process.

The low pH value detected in the material of younger piles (Fig. 1) could probably be explained by the acidification of compost caused by microbial fatty acid formation. This low pH value could be a reason for an inhibitory effect on methanogens in this material. It was shown previously that these high-volatile fatty acid concentrations inhibit methanogenesis at slightly acidic pH values, for example, in anaerobic digesters and in acidic peat [2,33]. In compost piles, Beck-Friis et al. [4] observed volatile fatty acid concentrations up to $53 \text{mg g}^{-1} \text{dw}$ of compost material. The clear pH increase after about 4 weeks (Fig. 1) is probably attributable to the degradation of fatty acids in combination with an intensive production of ammonium [5]. The coincidence between detectable methane production potential and pH increase in the compost material (Fig. 1) was also revealed by Hellmann et al. [28].

In compost material older than 5 weeks, the methane production potential was clearly enhanced and the maximum methane production potential was observed in material from 6-week-old piles (Fig. 1). The composition of detectable methanogenic populations changed notably within this phase of compost

maturation. This was indicated by the results of the cloning analysis (Fig. 4), as well as by a significant difference in methane production at 70°C (Fig. 3). A total of 86% of the generated clones from 6-week-old pile material showed a closest relationship to species of the genus *Methanothermobacter*, which were also found earlier by cultivation analysis of mushroom compost [14]. Since species of the genus *Methanothermobacter* are known to grow quickly at temperatures between 55 and 65°C [21], the predominance of the corresponding OTU in the 6-week-old material may be a reason for the conspicuous high methane production rate of this material at 70°C (Fig. 3). In contrast, the dominant OTU in the 8-week-old and mature compost is represented by relatives of *Methanosarcina thermophila*, a thermophilic methanogen with a lower optimum growth temperature of $50\text{--}55^\circ\text{C}$ [21].

Quantification of methanogens in the 6-week-old material by the methane production rate showed values of about 6×10^7 methanogens $\text{g}^{-1} \text{dw}$. The MPN-PCR revealed similar numbers of $0.2\text{--}4 \times 10^7$ cells $\text{g}^{-1} \text{dw}$. These numbers are comparable to the 10^8 thermophilic methanogens $\text{g}^{-1} \text{dw}$ which were found by Derikx et al. [14]. Considering the results of Ishii et al. [35], who detected $10^{10}\text{--}10^{11}$ total cells $\text{g}^{-1} \text{dw}$, we assume that methanogens represent $0.01\text{--}0.1\%$ of the total cell number in the compost material. This is also supported by ratios of $0.004\text{--}0.1\%$ of *Archaea* to *Bacteria* revealed by MPN-PCR during the compost maturation. These results, in combination with the high background fluorescence of compost particles, which was often observed during fluorescence microscopy, may explain why we were not able to detect methanogenic cells by FISH analysis in the compost material (data not shown).

The archaeal cell numbers detected in compost are comparatively low. For example, Ahring [1] determined up to 10^{11} methanogens ml^{-1} by MPN analysis in digesters with cow, pig, and 15% organic industrial waste (average water content in biogas reactors 83% [74]). Compost represents a good but not an ideal environment for methanogenic *Archaea* because the degradation of organic material mainly takes place under oxic conditions. The lower cell numbers may be caused by the low water content in compost compared to digesters, which presumably limits the diffusion of anaerobic metabolites and therefore the substrate availability. This assumption is also supported by the observed positive correlation between increasing water content and potential methane production.

In the 6-week-old material, the dominant methanogen seems to be represented by *Methanothermobacter* sp., whereas in the 8-week-old material the community is dominated by sequences related to *Methanosarcina thermophila*. Since mean heap temperatures in the 6- and 8-week-old piles are very similar [37], the population

shift has to be attributed to another regulating factor. *Methanothermobacter* spp. are hydrogenotrophic methanogens, whereas *Methanosarcina thermophila* generally uses acetate, methanol or methylamine, which indicates that a change in the substrate composition could have been responsible for the altered methanogenic population. However, under specific conditions, strains of *Methanosarcina thermophila* seem to be able to use H_2/CO_2 as well [54]. The high number of relatives of *Methanosarcina thermophila* is remarkable because in thermophilic anaerobic digesters acetate-utilising methanogens normally occur in proportions as low as 0.001–0.4%, compared to hydrogen-utilising methanogens [1].

Microbial diversity within a compost heap depends on several factors, including the maturity of the material and its temperature. The increase of fungal and bacterial diversity during the late and more mesophilic phase of compost maturation is generally called “recolonisation” [49]. Optimal temperatures for a high microbial diversity range between 35 and 40 °C [71]. These factors could be observed influencing the diversity of archaeal communities as well (Fig. 4). As can be seen in Fig. 6, a higher number of analysed clones from mature compost material would have revealed further diversity. A similar increase in archaeal diversity was observed by Cahyani et al. [7] during rice straw composting after in situ temperatures decreased below 50 °C. These authors presumed that the methanogens present had been killed by high temperatures because of the absence of archaeal specific PCR products amplified from DNA which was extracted from compost material in the thermophilic phase. However, they detected members of Rice cluster I which we also found in the present study accounting for 11.6% of the analysed clones in the mature compost material (Fig. 4). Fey et al. [19] observed that RC-I methanogens were almost exclusively prevalent in rice field soil if they incubated the soil at 45 or 50 °C. They assumed that Rice cluster I methanogens were responsible for thermophilic CH_4 production.

In our study, *Methanobacterium formicicum*, another moderate thermophilic methanogen, was detected in mature compost material. With a proportion of 11.6% of the analysed clones, it also seems to belong to one of the abundant methanogens in the mature compost material. *Methanobacterium formicicum* utilises H_2/CO_2 as substrate [21] and was often found to dominate in anaerobic digesters [22,43,52].

One OTU corresponding to 2.3% of the analysed clones in the mature material could be assigned to Rice cluster III. This cluster represents one of the uncultured euryarchaeotal lineages that were detected in rice paddies [9,24,61] and in soil samples from a riparian flooding gradient [41]. Kemnitz et al. [42] speculated that their enriched RC-III archaeon was a heterotrophic anaerobic, mesophilic and neutrophilic microorganism

which utilises oligopeptides for growth, presumably by fermentation. Furthermore, they supposed that members of this group depend on products of decomposing organisms sharing the same habitat. Therefore, compost may represent an ideal environment for those organisms. The amount of microbial cells basically seems stable during a composting process. On the one hand, Ishii et al. [35] detected that total countable cells rapidly reached a stable number after the start of a composting process. Riddech et al. [62] showed that the microbial carbon content decreased during composting of organic waste by a coefficient of only 3.6 (from 2788 to 770 $\mu g C_{mic} g^{-1} dw$) from days 42 to 240. Similarly, Hellmann et al. [28] showed that concentrations of total PLFA only ranged between 1300 and 650 $nmol g^{-1} dw$. On the other hand, a dramatic shift in the bacterial communities during compost maturation has been observed by PLFA analyses or molecular methods [28,29,35,47,60]. From these results, a high microbial turnover rate can be assumed. Thus, the heap conditions characterise compost as an ideal environment for members of Rice cluster III with the presumed metabolic activity.

Most frequently, thermophilic methanogenic *Archaea* have been isolated from natural environments such as hot oil fields [55,58,63], hot springs in deep lakes or marine sediments [17,18,38,39,67], as well as from anthropogenic habitats like anaerobic digesters [8].

We showed that *Methanothermobacter* spp., *Methanosarcina thermophila* and *Methanobacterium formicicum* are the apparent dominating thermophilic methanogens within a much more complex and up to now uncultured archaeal community in composting piles.

Thermophilic methanogens, however, are also supposed to exist in mesophilic habitats such as rice fields [76] or cold environments like cold lakes [56]. Wu et al. [75] concluded that the category of moderate thermophilic methanogens is probably widespread in temperate anoxic soils. To date, the origin of those thermophilic methanogens and fermenting bacteria in psychrophilic or mesophilic habitats still remains unclear [19]. Nevertheless, in relation to this question, compost material used as a soil amendment can presumably be regarded as an effective carrier enhancing the proliferation of moderate thermophilic methanogens.

Acknowledgement

This work was financially supported by grants from the Justus-Liebig-University, Giessen. We acknowledge Steven M. Holland for providing the freeware programme Analytic Rarefaction and Kerstin Fallschissel and Nicole Lodders for their valuable comments on the manuscript.

References

- [1] B.K. Ahring, Methanogenesis in thermophilic biogas reactors, *A. v. Leeuwenhoek* 67 (1995) 91–102.
- [2] G.K. Anderson, T. Donnelly, K.J. McKeown, Identification and control of inhibition in the anaerobic treatment of industrial wastewaters process. *Biochem. July/August* (1982) 28–32.
- [3] O. Ayalon, Y. Avnimelech, Solid waste treatment as a high-priority and low cost alternative for greenhouse gas mitigation, *Environ. Manage.* 27 (2001) 697–704.
- [4] B. Beck-Friis, M. Pell, U. Sonesson, H. Jönsson, H. Kirchmann, Formation and emission of N₂O and CH₄ from compost heaps of organic household waste, *Environ. Monit. Assess.* 62 (2000) 317–331.
- [5] B. Beck-Friis, S. Smars, H. Jönssen, Y. Eklind, H. Kirchmann, Composting of source-separated household organics at different oxygen levels: gaining an understanding of the emission dynamics, *Compost Sci. Util.* 11 (2003) 41–50.
- [6] W. Bidlingmaier, *Biologische Abfallverwertung*, Ulmer, Stuttgart, 2000.
- [7] V.R. Cahyani, K. Matsuya, S. Asakawa, M. Kimura, Succession and phylogenetic profile of methanogenic archaeal communities during the composting process of rice straw estimated by PCR-DGGE analysis, *Soil Sci. Plant Nutr.* 50 (2004) 555–563.
- [8] M. Chachkhiani, P. Dabert, T. Abzianidze, G. Partskhaladze, L. Tsiklauri, T. Dudaui, J.-J. Godon, 16S rDNA characterisation of bacterial and archaeal communities during start-up of anaerobic thermophilic digestion of cattle manure, *Bioresour. Technol.* 93 (2004) 227–232.
- [9] K.-J. Chin, T. Lukow, R. Conrad, Effect of temperature on structure and function of the methanogenic archaeal community in an anoxic rice field soil, *Appl. Environ. Microbiol.* 65 (1999) 2341–2349.
- [10] R. Chouari, D. Le Paslier, P. Daengelen, P. Ginestet, J. Weissenbach, A. Sghir, Novel predominant archaeal and bacterial groups revealed by molecular analysis of an anaerobic sludge digester, *Environ. Microbiol.* 7 (2005) 1104–1115.
- [11] M.A. Cole, L. Zhang, X. Liu, Remediation of pesticide contaminated soil by planting and compost addition, *Compost Sci. Util.* 3 (1995) 20–30.
- [12] M. De Bertoldi, F. Zuconi, Composting of organic residues, *Bioenviron. Systems* 3 (1987) 95–141.
- [13] J.C. De Man, MPN-tables corrected, *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 17 (1983) 301–305.
- [14] P.J.L. Derikx, G.A.H. de Jong, H.J.M. Op den Camp, C. van der Drift, L.J.L.D. van Griesven, G.D. Vogels, Isolation and characterization of thermophilic methanogenic bacteria from mushroom compost, *FEMS Microbiol. Ecol.* 62 (1989) 251–258.
- [15] W.A. Dick, E.L. McCoy, Enhancing soil fertility by addition of compost, in: H.A.J. Hoitink, H.M. Keener (Eds.), *Science and Engineering of Composting: Design, Environmental, Microbiological and Utilization aspects*, Renaissance Publications, Worthington, OH, 1993, pp. 622–644.
- [16] M.A. Dojka, P. Hugenholtz, S.K. Haak, N.R. Pace, Microbial diversity in a hydrocarbon- and chlorinated-solvent-contaminated aquifer undergoing intrinsic bioremediation, *Appl. Environ. Microbiol.* 64 (1998) 3869–3877.
- [17] L. Elsgaard, M.F. Isaksen, B.B. Joergensen, A.M. Alayse, H.W. Jannasch, Microbial sulphate reduction in deep-sea sediments at the Guaymas basin – hydrothermal vent area – influence of temperature and substrates, *Geochim. Cosmochim. Acta* 58 (1994) 3335–3343.
- [18] L. Elsgaard, D. Prieur, G.M. Mukwaya, B.B. Joergensen, Thermophilic sulphate reduction in hydrothermal sediment of Lake Tanganyika, East Africa, *Appl. Environ. Microbiol.* 60 (1994) 1473–1480.
- [19] A. Fey, K.J. Chin, R. Conrad, Thermophilic methanogens in rice field soil, *Environ. Microbiol.* 3 (2001) 295–303.
- [20] J. Fritz, U. Link, R. Braun, Environmental impacts of biobased/biodegradable packaging, *Starch/Stärke* 53 (2001) 105–109.
- [21] G.M. Garrity, J.G. Holt, in: D.R. Boone, R.W. Castenholz (Eds.), *Euryarchaeota. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 1, Springer, New York, 2001, pp. 211–354.
- [22] J.J. Godon, E. Zumstein, P. Dabert, F. Habouzit, R. Moletta, Molecular diversity of an anaerobic digester as determined by small-subunit rDNA sequence analysis, *Appl. Environ. Microbiol.* 63 (1997) 2802–2813.
- [23] R. Großkopf, P.H. Janssen, W. Liesack, Diversity and structure of the methanogenic community in anoxic rice paddy soil microcosms as examined by cultivation and direct 16S rRNA gene sequence retrieval, *Appl. Environ. Microbiol.* 64 (1998) 960–969.
- [24] R. Großkopf, S. Stubner, W. Liesack, Novel euryarchaeotal lineages detected on rice roots and in the anoxic bulk soil of flooded rice microcosms, *Appl. Environ. Microbiol.* 64 (1998) 4983–4989.
- [25] Y. He, Y. Inamori, M. Mizuochi, H. Kong, N. Iwami, T. Sun, Measurements of N₂O and CH₄ from the aerated composting of food waste, *Sci. Tot. Environ.* 254 (2000) 65–74.
- [26] H.J. Hellebrand, Emission of nitrous oxide and other trace gases during composting of grass and green waste, *J. Agric. Eng. Res.* 69 (1998) 365–375.
- [27] B. Hellmann, *Freisetzung Klimarelevanter Spurengase in Bereichen mit hoher Akkumulation von Biomassen*, Zeller Verlag, Osnabrück, 1995.
- [28] B. Hellmann, L. Zelles, A. Palojärvi, Q. Bai, Emission of climate-relevant trace gases and succession of microbial communities during open-windrow composting, *Appl. Environ. Microbiol.* 63 (1997) 1011–1018.
- [29] R.F. Herrmann, J.F. Shann, Microbial community changes during the composting of municipal solid waste, *Microbiol. Ecol.* 33 (1997) 78–85.
- [30] K.L. Hershberger, S.M. Barns, A.L. Reysenbach, S.C. Dawson, N.R. Pace, Wide diversity of crenarchaeota, *Nature* 384 (1996) 420.
- [31] H.A.J. Hoitink, P.C. Fahy, Basis for the control of soilborne plant pathogens with composts, *Annu. Rev. Phytopathol.* 24 (1986) 93–114.

- [32] D.E. Holmes, D.R. Bond, R.A. O'Neil, C.E. Reimers, L.R. Tender, D.R. Lovley, Microbial communities associated with electrodes harvesting electricity from a variety of aquatic sediments, *Microb. Ecol.* 48 (2004) 178–190.
- [33] M.A. Horn, C. Matthies, K. Küsel, A. Schramm, H.L. Drake, Hydrogenotrophic methanogenesis by moderately acid-tolerant methanogens of a methane-emitting acidic peat, *Appl. Environ. Microbiol.* 69 (2003) 74–83.
- [34] L.N. Huang, Y.Q. Chen, H. Zhou, S. Luo, C.Y. Lan, L.H. Qu, Characterisation of methanogenic *Archaea* in the leachate of a closed municipal solid waste landfill, *FEMS Microbiol. Ecol.* 46 (2003) 171–177.
- [35] K. Ishii, M. Fukui, S. Takii, Microbial succession during a composting process as evaluated by denaturing gradient gel electrophoresis analysis, *J. Appl. Microbiol.* 89 (2000) 768–777.
- [36] U. Jäckel, P. Kämpfer, in: B. Hösel, S. Schenkel (Eds.), *Mikrobiologie der Kompostierung, Müll-Handbuch*, Erich Schmidt Verlag, Berlin, 2003, pp. 1–24.
- [37] U. Jäckel, K. Thummes, P. Kämpfer, Thermophilic methane production and oxidation in compost, *FEMS Microbiol. Ecol.* 52 (2005) 175–184.
- [38] C. Jeanthon, Molecular ecology of hydrothermal vent microbial communities, *Ant. v. Leeuwenhoek* 77 (2000) 117–133.
- [39] B.B. Joergensen, M.F. Isaksen, H.W. Jannasch, Bacterial sulphate reduction above 100 °C in deep-sea hydrothermal vent sediments, *Science* 258 (1992) 1756–1757.
- [40] G. Jobb, TREEFINDER version of October 2005, Munich, Germany. Distributed by the author at <www.treefinder.de>.
- [41] D. Kemnitz, K.-J. Chin, P. Bodelier, R. Conrad, Community analysis of methanogenic *Archaea* within a riparian flooding gradient, *Environ. Microbiol.* 6 (2004) 449–461.
- [42] D. Kemnitz, S. Kolb, R. Conrad, Phenotypic characterization of Rice Cluster III *Archaea* without prior isolation by applying quantitative polymerase chain reaction to an enrichment culture, *Environ. Microbiol.* 7 (2005) 553–565.
- [43] H.A. Kobayashi, E.C. DeMacario, R.S. Williams, A.J.L. Macario, Direct characterization of methanogens in two high-rate anaerobic biological reactors, *Appl. Environ. Microbiol.* 54 (1988) 693–698.
- [44] O.R. Kotsyurbenko, K.-J. Chin, M.V. Glagolev, S. Stubner, M. Simankova, A.N. Nozhevnikova, R. Conrad, Acetoclastic and hydrogenotrophic methane production and methanogenic populations in an acidic West-Siberian peat bog, *Environ. Microbiol.* 6 (2004) 1159–1173.
- [45] C.A. Kreader, Relief of amplification inhibition with bovine serum albumin or T4 gene 32 protein, *Appl. Environ. Microbiol.* 62 (1996) 1102–1106.
- [46] S. Kumar, K. Tamura, M. Nei, MEGA3: integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment, *Brief Bioinform.* 5 (2004) 150–163.
- [47] M.G. LaMontagne Jr., F.C. Michel, P.A. Holden, C.A. Reddy, Evaluation of extraction and purification methods for obtaining PCR-amplifiable DNA from compost for microbial community analysis, *J. Microbiol. Methods* 49 (2002) 255–264.
- [48] M. Loferer-Kroefßbacher, J. Klima, R. Psenner, Determination of bacterial dry mass by transmission electron microscopy and densitometric image analysis, *Appl. Environ. Microbiol.* 64 (1997) 688–694.
- [49] J. Lott Fischer, A. Albrecht, P. Kämpfer, in: P. Kämpfer, W.D. Weiffenfels (Eds.), *Mikrobiologie der Kompostierung von Abfällen, Biologische Behandlung organischer Abfälle*, Springer, Berlin, Heidelberg, 2001, pp. 3–39.
- [50] Y. Lu, T. Lueders, M.W. Friedrich, R. Conrad, Detecting active methanogenic populations on rice roots using stable isotope probing, *Environ. Microbiol.* 7 (2005) 326–336.
- [51] T. Lueders, M. Friedrich, Archaeal population dynamics during sequential reduction process in rice field soil, *Appl. Environ. Microbiol.* 66 (2000) 2732–2742.
- [52] A.J.L. Macario, E.C. DeMacario, Quantitative immunological analysis of the methanogenic flora of digestors reveals a considerable diversity, *Appl. Environ. Microbiol.* 567 (1988) 79–86.
- [53] F.C. Miller, *Composting as a Process Based on the Control of Ecologically Selective Factors*, Marcel Dekker, Inc., New York, Basel, Hongkong, 1992.
- [54] Z. Mladenovska, B.K. Ahring, Mixotrophic growth of two thermophilic *Methanosarcina* strains, *Methanosarcina thermophila* TM-1 and *Methanosarcina* sp. SO-2P, on methanol and hydrogen/carbon dioxide, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 48 (1997) 385–388.
- [55] T.K. Ng, P.J. Weimer, L.J. Gawel, Possible non-anthropogenic origin of two methanogenic isolates from oil-producing wells in San Miquelito field, Ventura County, California, *Geomicrobiol. J.* 7 (1989) 185–192.
- [56] A.N. Nozhevnikova, C. Holliger, A. Amann, A.J.B. Zehnder, Methanogenesis in sediments from deep lakes at different temperatures (12–70 °C), *Water Sci. Technol.* 36 (1997) 57–64.
- [57] T. Ochsenreiter, D. Selezi, A. Quaiser, L. Bonch-Osmolovskaya, C. Schleper, Diversity and abundance of crenarchaeota in terrestrial habitats studied by 16S rRNA surveys and real time PCR, *Environ. Microbiol.* 5 (2003) 787–797.
- [58] V.J. Orphan, L.T. Taylor, D. Hafenbradl, E.F. DeLong, Culture-dependent and culture-independent characterization of microbial assemblages associated with high temperature petroleum reservoirs, *Appl. Environ. Microbiol.* 66 (2000) 700–711.
- [59] H.J. Perski, P. Schoenheit, R. Thauer, Sodium dependence of methane formation in methanogenic bacteria, *FEBS Lett.* 143 (1982) 323–326.
- [60] S. Peters, S. Koschinsky, F. Schwieger, C.C. Tebbe, Succession of microbial communities during hot composting as detected by PCR-single-strand-conformation polymorphism-based genetic profiles of small-subunit rRNA genes, *Appl. Environ. Microbiol.* 66 (2000) 930–936.
- [61] B. Ramakrishnan, T. Lueders, P. Dunfield, R. Conrad, M.W. Friedrich, rehaeal community structures in rice soils from different geographical regions before and after initiation of methane production, *FEMS Microbiol. Ecol.* 37 (2001) 175–186.

- [62] N. Riddech, S. Klammer, H. Insam, in: N. Riddech, S. Klammer, H. Insam (Eds.), *Microbiology of Composting*, Springer, Berlin, Heidelberg, 2002, pp. 43–51.
- [63] E.P. Rozanova, T.N. Nazina, A.S. Galushko, Isolation of a new genus of sulfate-reducing bacteria and description of a new species of this genus, *Desulfomicrobium ap-spheronum* gen. nov., sp. nov., *Microbiology* 57 (1988) 514–520.
- [64] J. Sambrook, D.W. Russel, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2001.
- [65] E. Schlichting, H.P. Blume, *Bodenkundliches Praktikum*, Verlag Paul Parey, Hamburg, 1966.
- [66] F. Schwieger, C.C. Tebbe, A new approach to utilise PCR-single-strand- conformation polymorphism for 16S rRNA gene-based microbial community analysis, *Appl. Environ. Microbiol.* 64 (1998) 4870–4876.
- [67] S.M. Sievert, J. Kuever, G. Muyzer, Identification of 16S ribosomal DNA defined bacterial populations at a shallow submarine hydrothermal vent near Milos Island (Greece), *Appl. Environ. Microbiol.* 66 (2000) 3102–3109.
- [68] S.G. Sommer, H.B. Moller, Emission of greenhouse gases during composting of deep litter from pig production – effect of straw content, *J. Agric. Sci.* 134 (2000) 327–335.
- [69] D.A. Stahl, R. Amann, in: E. Stackebrandt, M. Goodfellow (Eds.), *Development and Application of Nucleic Acid Probes in Bacterial Systematics*, *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*, Wiley, Chichester, 1991, pp. 205–248.
- [70] L.Y. Stein, G. Jones, B. Alexander, K. Elmund, C. Wright-Jones, K.H. Nealson, Intriguing microbial diversity associated with metal-rich particles from a freshwater reservoir, *FEMS Microbiol. Ecol.* 42 (2002) 431–440.
- [71] E.I. Stentiford, in: M. DeBertoldi, P. Sequi, B. Lemmes, T. Papi (Eds.), *Composting Control: Principles and Practice. The Science of Composting*, Blackie Academic and Professional, London, 1996, pp. 49–59.
- [72] Y.L. Tsai, B.H. Olson, Detection of low numbers of bacterial cells in soils and sediments by polymerase chain reaction, *Appl. Environ. Microbiol.* 58 (1991) 754–757.
- [73] K. Watanabe, Y. Kodama, N. Hamamura, N. Kaku, Diversity, abundance, and activity of archaeal populations in oil-contaminated groundwater accumulated at the bottom of an underground crude oil storage cavity, *Appl. Environ. Microbiol.* 68 (2002) 3899–3907.
- [74] P. Weiland, in: P. Kämpfer, W.D. Weiffenfels (Eds.), *Verfahrenstechnik der anaeroben Behandlung organischer Abfälle, Biologische Behandlung organischer Abfälle*, Springer, Berlin, Heidelberg, 2001, pp. 3–39.
- [75] X.-L. Wu, M.W. Friedrich, R. Conrad, Diversity and ubiquity of thermophilic methanogenic *Archaea* in temperate soils, *Environ. Microbiol.* 8 (2005) 394–404.
- [76] S.-S. Yang, H.-L. Chang H-L, Effect of environmental conditions on methane production and emission from paddy soil, *Agric. Ecosys. Environ.* 69 (1998) 69–80.

Anhang B



ELSEVIER

Available online at www.sciencedirect.com

Systematic and Applied Microbiology 30 (2007) 634–643

**SYSTEMATIC AND
APPLIED MICROBIOLOGY**

www.elsevier.de/syapm

Thermophilic methanogenic *Archaea* in compost material: Occurrence, persistence and possible mechanisms for their distribution to other environments

Kathrin Thummes^a, Jenny Schäfer^a, Peter Kämpfer^a, Udo Jäckel^{a,b,*}^aInstitut für Angewandte Mikrobiologie, Justus-Liebig-Universität Giessen, Heinrich-Buff-Ring 26-32, D-35392 Giessen, Germany^bBundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin, Nöldnerstraße 40-42, D-10317 Berlin, Germany

Received 22 June 2007

Abstract

Since compost is widely used as soil amendment and the fact that during the processing of compost material high amounts of microorganisms are released into the air, we investigated whether compost may act as a carrier for thermophilic methanogens to temperate soils.

All eight investigated compost materials showed a clear methane production potential between 0.01 and 0.98 $\mu\text{mol CH}_4 \text{ g dw}^{-1} \text{ h}^{-1}$ at 50 °C. Single strand conformation polymorphism (SSCP) and cloning analysis indicated the presence of *Methanosarcina thermophila*, *Methanoculleus thermophilus*, and *Methanobacterium formicicum*.

Bioaerosols collected during the turning of a compost pile showed both a highly similar SSCP profile compared to the corresponding compost material and clear methane production during anoxic incubation in selective medium at 50 °C. Both observations indicated a considerable release of thermophilic methanogens into the air.

To analyse the persistence of compost-borne thermophilic methanogens in temperate oxic soils, we therefore studied their potential activity in compost and compost/soil mixtures, which was brought to a meadow soil, as well as in an agricultural soil fertilised with compost. After 24 h anoxic incubation at 50 °C, all samples containing compost showed a clear methanogenic activity, even 1 year after application.

In combination with the *in vitro* observed resilience of the compost-borne methanogens against desiccation and UV radiation we assume that compost material acts as an effective carrier for the distribution of thermophilic methanogens by fertilisation and wind.

© 2007 Elsevier GmbH. All rights reserved.

Keywords: Compost; Thermophilic methane production; *Methanosarcina thermophila*; *Methanoculleus thermophilus*; Bioaerosols; UV-light; Desiccation

Introduction

Thermophilic or hyperthermophilic microorganisms have been isolated from environments with elevated

temperatures, e.g. hydrothermal vents in freshwater lakes and ocean sediments [10,11,22,23,37], geo- and hydrothermal environments [25,38], or hot springs [2]. However, thermophiles also seem to exist in permanent cold or temperate environments [6,28,29,43], although the environmental conditions are not ideal. Until now, little has been known about the origin of these microorganisms in the aforementioned environments,

*Corresponding author. Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin, Nöldnerstraße 40-42, D-10317 Berlin, Germany.

E-mail address: Jaeckel.Udo@baua.bund.de (U. Jäckel).

although some thermophiles might be able to grow at mesophilic temperatures because of their large temperature range [43]. This would be one possible explanation for their existence in moderate environments. The input of microorganisms via air from volcanic or geothermic/hydrothermic habitats might be a further explanation for their distribution [6]. Additionally, the fertilisation of arable soil with cattle manure, which is well known to contain anaerobic methanogens, was studied and found to be an inoculum for species of thermophilic methanogenic *Methanoculleus* and *Methanosarcina* [16]. These results confirm the assumption of Fey et al. [13], who detected thermophilic methanogens in paddy soil, that these organisms are widespread in different soil habitats. The strictly anaerobic *Archaea* do not form any resting stages, thus their survival in oxic soils is astonishing. Peters and Conrad [31] enriched anaerobic methanogenic *Archaea* from desert soil, cultivated soil and forest soil. The good survival of methanogens during O₂ exposure was earlier described in different studies [12,24].

During the last decade, the separate collection of organic wastes has become a part of everyday life in Germany, and nowadays up to 7.2 mio t of biowastes are treated in 900 composting plants and biogas reactors. The main application of compost is its recycling through the soil–plant system and therefore the annual 4.5mio t of composts produced are mainly applied as soil amendment to agricultural

soils (www.BMU.de). Beside the beneficial effects of compost on soils, e.g. improvement of structure [3] and fertility [14], these anthropogenic activities influence the microbial community structure and diversity [32,33].

Nevertheless, thermophilic granular sludge and compost material, both of which have been shown as a potential source for thermophilic methanogens [21,36,40], were not considered as carriers of these organisms to oxic and moderate soils. Therefore, we analysed the thermophilic methanogenic community in compost materials from different origins, as well as their potential distribution to oxic soil by fertilisation and by air transport.

Material and methods

Samples

Sample collection of the compost materials (Table 1) took place according to Thummes et al. [39]. To get a representative sample of each investigated compost pile, three sampling points per heap were selected, one in the centre and one at each end, each at a depth of 20 cm. Approximately 500 g of compost material were collected from the three points, and they were pooled, mixed and sieved over 4 mm in the laboratory.

Table 1. Investigated compost material: origin, features of processing, age, pH, and potential methane production rate in anoxic incubations at 36, 50 and 65 °C

Sample	Processed material	Processing method [44]	Turning of piles	Capacity (t/a)	Age of the material sampled	pH	µmol CH ₄ g dw ⁻¹ h ⁻¹ ±SD		
							36 °C	50 °C	65 °C
CC	1:3.5 Loppings, bio waste	Open windrow composting (initial 3–4 weeks GORE™-Cover)	2–3 × / week	10 000	11 weeks	7.2	0.02±0.005	0.34±0.042	0.32±0.050
NC	1:4 Loppings, bio waste	Tunnel-composting	2 × /week	20 000	20 weeks	8.1	0.001±0.0003	0.01±0.002	0.004±0.0007
TC	Bio waste	Tunnel-composting	No	37 000	12 days	7.7	0.04±0.005	0.12±0.030	2.75±0.135
AC	Bio waste	Box-composting	No	30 000	4 weeks	7.3	0.09±0.008	0.47±0.02	1.33±0.07
HC	Loppings	Open windrow (not aerated)	4 × /a	1200	1 year	7.4	0.0	0.02±0.003	0.0
MC	Loppings	Open windrow (not aerated)	4 × /a	1200	1 year	7.0	0.001±0.0001	0.088±0.005	0.01±0.004
UC	Loppings	Open windrow (not aerated)	5 × /a	1200	2 year	7.4	0.0004±0.0	0.977±0.008	0.018±0.0004
SC	Loppings	Open windrow (not aerated)	5 × /a	1200	2 year	7.6	0.006±0.0	0.048±0.012	0.021±0.001

Bio waste: organic waste from domestic organic (kitchen) waste. Loppings: leaf fall, tree pruning, garden clippings and other cellulose and lignin-rich materials.

Investigation of compost application to meadow soil and arable soil

Mature compost material was taken from different depths of a mature compost pile at the CC plant (Table 1). The investigated soil was taken from the top 15 cm of a gleysol with the texture of a sandy loam over clay (pH 6.0) from a meadow near Giessen (Germany). This meadow had been managed without organic fertilisation and mowed twice a year for the last 50 years. Compost and the soil were mixed in a proportion of 1:3. Subsequently, the compost/soil-mixture, pure soil and pure compost were filled in flower pots (OD Plastik, Denmark, \varnothing 10 cm, height 7 cm) and dug into the meadow. Per assay, 21 parallels were prepared, so that three parallels, respectively, could be sampled at every sampling date. Samples were collected each month and analysed for thermophilic methane production potential.

The arable soil investigated in this study was fertilised with CC compost for approximately 10 years by applying $10 \text{ t ha}^{-1} \text{ yr}^{-1}$ regularly with a compost-disperser after harvest. The soil was not ploughed. In parallel, a control sample was taken from an adjacent acre, which was managed in a conventional way (ploughing and mineral fertilisers).

pH measurement

pH measurements were carried out as described earlier [39].

Potential methane production measurements

To measure the potential methane production of the methanogens in compost material and soil, 10 g and 4 g (fresh weight) aliquots, respectively, were incubated under N_2 atmosphere in sterile 120-ml serum bottles closed with butyl stoppers. To overcome limiting substrate diffusion, 10 ml of anoxic water (N_2 -bubbled) was added, and thus a water content of about 60% of maximum water holding capacity was reached. At this moisture level the maximum potential methane production takes place [39]. Samples were incubated in triplicates.

To measure the potential methane production of the methanogens in the bioaerosols, the loaded gelatine filters were incubated anoxically with 50 ml of *Methanosarcina* specific medium 164 (www.DSMZ.de, prepared according to Widdel et al. [42]). The methane mixing ratios in the headspace were observed during anoxic incubation in the dark at 50°C , using a gas-chromatograph equipped with a flame ionisation detector, as described earlier [39].

Desiccation tolerance was tested with mature CC compost, which was sieved to 2 mm and filled in a washing bottle (approx. 400 g). A tube connected one of the outlets with a vacuum pump which sucked laboratory air continuously through the compost material. After 1.5, 3.5, and 5.25 h (corresponding to 2.7, 5.3, and 6.9 m^3 air, respectively), samples were taken, remoistened and incubated anoxically, as specified above.

For the UV exposure experiment, mature CC compost was sieved to 2 mm. Approximately 300 g were evenly spread on a table (layer thickness approximately 2–3 mm). A UV lamp (VL-315 G, LTF-Labortechnik, Wasserburg; 254 nm, $3 \times 15 \text{ w}$) was placed 1 m above the table and the compost was irradiated for 4 h (corresponding to a dose of 13.7 kJ m^{-2}) and 24 h (corresponding to a dose of 82.1 kJ m^{-2}), respectively. As a control, in parallel, material of the same compost was spread on another table in the same way but without irradiation. Every hour the compost was mixed and the irradiation and air-drying continued. After treatment the samples were remoistened and incubated as described above.

Bioaerosol collection

The bioaerosols were collected at the CC plant (Table 1) during the turning of the compost piles by filtration, directly beneath the turned heap. The sampling was performed with a MD8 Airport system (Sartorius, Göttingen) on gelatine filters (\varnothing 80 mm, pore size $3 \mu\text{m}$; Sartorius, Göttingen). The filter used for DNA extraction was loaded with 1 m^3 of filtered air during the processing of an 11-week-old heap. In parallel, compost material from this heap was collected as described above. The filters used for potential methane production measurements were loaded with 0.1, 0.3, 0.5 and 1 m^3 filtered air during the turning of a 13-, 10- and two 4-week-old heaps, respectively.

Additionally, control filters were loaded at a 1 km distance from the composting plant with 1 m^3 of filtered air and treated in the same way.

DNA extraction

DNA extraction from soil and compost material

Total community DNA was extracted directly from 0.5 g fresh compost material or soil using the FastDNA[®] Spin[®] Kit for soil (BIO101 systems, Qiogene, Irvine, CA) following the manufacturer's instructions. DNA was eluted from the columns with 50 μl manufacturer-supplied DES. This DNA-extract was used for all further molecular methods.

DNA extraction from the filters loaded with bioaerosols

Gelatine filters were cut with a sterile scalpel and mixed with 10 ml of sterile NaCl [wt/vol] which contained 2% Tween 80[®] (Sigma-Aldrich, Darmstadt). The mixture was shaken gently in a water bath (Koettermann, Uetze/Haenigsen) for 15 min at 30 °C and subsequently centrifuged. The pellet obtained was washed with TE-buffer and re-suspended in 1 ml DNase and RNase free water. The DNA out of this cell suspension was extracted as indicated above.

Detection of *Archaea* by SSCP and cloning

The PCR for Single strand conformation polymorphism (SSCP) was processed using the A112f [17] and the w036f primer [26] targeting the 16S rRNA of *Archaea*. The latter was used as a reverse primer (sequence reverse complement) and named x036r. The reverse primer was phosphorylated at the 5' end. The amplification resulted in PCR fragments of 245 bp length. The PCR was performed in a total volume of 25 µl. For each sample, four parallel PCR assays were prepared. Reaction mixture contained 2.5 µl × PCR-buffer, 3.0 µl MgCl₂ (25 mM), 2.5 µl dNTPs (2 mM), 0.5 µl of each primer (25 µM, MWG Biotech, Ebersberg, Germany), 15.9 µl RNase and DNase free water (Invitrogen, Carlsbad, CA), 0.1 µl BSA (20 mg ml⁻¹), 0.1 µl Taq-polymerase (5 U µl⁻¹) (all MBI Fermentas, St. Leon Rot), and 1 µl of DNA-extract (diluted 1:10 with RNase and DNase free water). Touchdown-PCR was carried out in a Thermocycler (MyCycler[™], BioRad, München, Germany) with an initial denaturation step at 95 °C for 3 min, followed by 20 cycles of successive denaturation (94 °C for 20 s), annealing (for 20 s: first cycle at 65 °C, for every further repeat a decrease of 0.5 °C down to 55 °C) and extension (72 °C for 20 s), and a further 15 cycles of successive denaturation at 94 °C for 20 s, annealing at 55 °C for 20 s and extension for 20 s at 72 °C, completed with a terminal extension step for 20 min at 72 °C. All four parallels were pooled, purified (PCR Purification Kit 250, QiaQuick[®], Qiagen, Hilden) and quantified photometrically (Ultraspec 4000, Amersham Biosciences, Freiburg).

An amount of 1000 ng double-stranded amplified DNA was converted to single-stranded products by selective removal of the reverse phosphorylated strand with 2.5 U lambda-exonuclease (New England Biolabs, Frankfurt/Main) in 1 × exonuclease buffer (provided by the manufacturer) at 37 °C for 45 min. Digestion was stopped by starting the purification of the remaining single-strands (MinElute PCR purification Kit, Qiagen, Hilden) according to the manufacturer's instructions. Single-stranded DNA was eluted with 10 µl EB buffer included in the kit, and, subsequently, DNA was denatured. In addition, DNA of five pure cultures was

treated in the same way in order to use the single-stranded PCR products as standards in the SSCP gel electrophoresis. Pure cultures were received from the DSMZ (www.DSMZ.de): *Methanothermobacter thermoautotrophicum* (DSMZ 9446, Z37156), *Methanosarcina thermophila* (DSMZ 1825^T, M59140), *Methanoculleus thermophilus* (DSMZ 3915, M59129), *Methanobacterium formicicum* (DSMZ 10111, AF028689), and *Methanosarcina barkeri* (DSM 10131, AF028692).

The SSCP gel electrophoresis was performed according to Dormann and Tebbe [9]. For PCR-SSCP of archaeal 16S rRNA fragments the gel matrix consisted of 0.725 MDE gel solution (Cambrex Bio Science, Belgium), 10% [wt/vol] formamide, 1 × TBE buffer (tris-boric acid-EDTA (ethylene-diamine-tetra-acetate pH 8)), 4% ammonium persulfate and 0.04% [wt/vol] *N,N,N',N'*-tetramethylethylenediamine. The gel was quickly poured between the glass plates using 0.35 mm spacers. After polymerisation, 4 µl of denatured samples were loaded into the wells and the electrophoresis took place at a constant 450 V and 19.5 °C for 12 h. The clear separation of five different archaeal strains is shown in Fig. 1.

Selected products ("bands", Fig. 2), identified in MDE polyacrylamide gel after silver staining [4], were excised with a sterile scalpel. Elution of the single-stranded DNA was performed according to the manual of Sambrook and Russell [34]. The single-strand DNA molecules were reamplified using the same primers and conditions as for the corresponding SSCP analysis, whereas the primer x036r was used unphosphorylated. PCR products were visualised on an ethidium bromide stained 1.7% agarose gel and subsequently purified

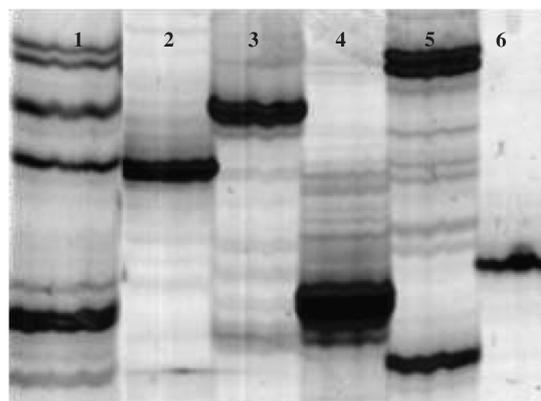


Fig. 1. SSCP patterns from single-stranded PCR products obtained from amplifications with archaeal specific primers A112rf/x036r-PH. A total of 1 µl of a pure liquid culture of five archaeal strains was used as the template for PCR. 1: Standard mixture, 2: *Methanobacterium formicicum*, 3: *Methanoculleus thermophilus*, 4: *Methanosarcina barkeri*, 5: *Methanosarcina thermophila*, 6: *Methanothermobacter thermoautotrophicum*.

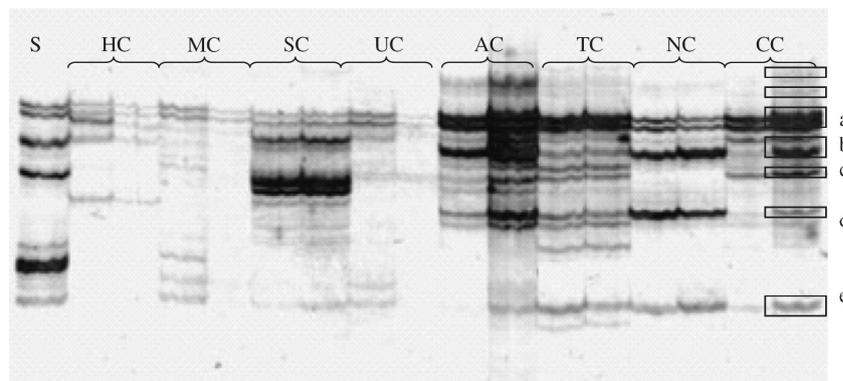


Fig. 2. SSCP patterns from single-stranded PCR products obtained from amplifications with archaeal specific primers A112rf/x036r-PH. DNA directly extracted from compost material (CC, NC, AC, HC, SC, TC, MC, UC) was used as a template. S indicates the SSCP pattern of a mixture of PCR products from 16S rRNA of 5 methanogenic archaeal strains (Fig. 1). Two independent DNA extractions were performed per assay and they were applied on the gel as parallels. The black boxes indicate the selected products for sub-cloning.

(PCR Purification Kit 250, QiaQuick[®], Quiagen, Hilden). For subcloning of amplicons the TOPO TA Cloning[®] Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA) was used. The cloning was performed according to the details given by the manufacturer. A total of 15 clones per “band” were analysed by means of RFLP analysis by digestion of the amplicons with the endonuclease *Hpa II*. Different operational taxonomic units (OTUs) were evaluated visually on a 3% agarose gel. Corresponding clones were recultivated to perform plasmid-extraction with alkaline lysis [34]. For sequencing, the M13r sequencing primer (Invitrogen, Carlsbad, CA) was used in combination with the AbiPrism[®] BigDye[™]Primer Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Weiterstadt). Subsequently, in order to assign the sequences to their closest relatives, a BLAST search (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) was performed.

Nucleotide sequence accession numbers

The 16S rRNA gene sequences determined in this study have been deposited in the GenBank database under accession no. AM747292 to AM747301.

Results

To investigate the potential methane production and the optimum temperature for methanogenesis in compost, samples of eight different compost materials were incubated anoxically at 36, 50, 65, and 80 °C. In comparison to the methane production rates at 50 °C, the production rates at 36 °C were relatively low in all materials (Table 1). Material HC showed no methane production at 36 °C, whereas at 80 °C, no methane

production could be observed in any compost material. In the TC and AC material, both from biowaste as basic raw material, an optimum methane production with 2.8 and 1.3 $\mu\text{mol methane g dw}^{-1} \text{h}^{-1}$, respectively, took place at 65 °C (Table 1). These rates were the highest production rates observed in this experiment. All other materials showed a maximum methane production at 50 °C.

For each compost material, two independent DNA extractions were performed, so that two SSCP patterns for each material could be generated (Fig. 2). These parallels were similar for all materials, which indicated good reproducibility of DNA extraction and PCR amplification. Compared with each other, the profiles of the materials showed similar patterns. To identify the predominant products by DNA sequencing, a total of five different DNA single strands (“bands”) were excised from the SSCP profile of CC (Fig. 2). Table 2 gives the number of clones sequenced per “band” and the closest relative for each molecular isolate. Sequencing indicated that in three cases (bands *b*, *c*, *e*) two different sequences were retrieved from a single band. In other cases, the bands only consisted of a single sequence (bands *a* and *d*). Band *d* could be assigned to the non-thermophilic methanogenic *Methanosarcina barkeri*, whereas *a* and *e* were presumably represented by single stranded DNA of thermophilic, acetoclastic *M. thermophila*. The most pronounced band *a* was present in all of the examined compost materials, as well as band *b*, which could be assigned to the presence of *M. thermophilus* (Table 2).

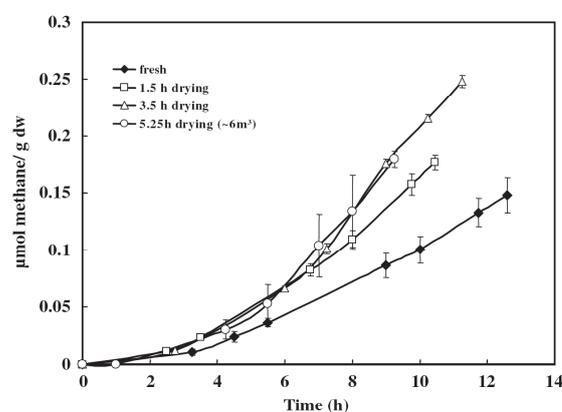
In order to examine the possibility of a distribution of thermophilic methanogens via air to temperate soils, we analysed the resilience of compost-borne methanogens against UV radiation and desiccation. The subsequent incubation experiments showed that no significant

Table 2. Characterisation of isolates, cloned from PCR-SSCP genetic profiles of archaeal 16S rRNA genes (Fig. 2) amplified from total DNA extracted from mature CC compost

Selected product	Clone	Closest relative based on partial sequence homology (acc. no.)	Sequence similarity (%)
a: 2 Clones sequenced	KT 1	<i>Methanosarcina thermophila</i> (M59140)	97
	KT 2	<i>Methanosarcina thermophila</i> (M59140)	97
b: 2 Clones sequenced	KT 3	<i>Methanoculleus thermophilus</i> (EF118906)	99
	KT 4	<i>Methanobacterium formicicum</i> (DQ649320)	96
c: 2 Clones sequenced	KT 5	<i>Methanosarcina thermophila</i> (M59140)	97
	KT 6	<i>Methanoculleus thermophilus</i> (EF118906)	99
d: 2 Clones sequenced	KT 7	<i>Methanosarcina barkeri</i> (CP000099)	97
	KT 8	<i>Methanosarcina barkeri</i> (CP000099)	98
e: 2 Clones sequenced	KT 9	<i>Methanosarcina barkeri</i> (CP000099)	97
	KT 10	<i>Methanosarcina thermophila</i> (M59140)	98

difference occurred between the methane accumulations in the anoxic incubations of the UV-treated samples and those of the control samples (only air dried, data not shown). After 26.5 h of anoxic incubation at 50 °C, the 4 h and the 24 h UV exposed compost material showed $110\% \pm 6.3\%$ ($2.3 \mu\text{mol CH}_4 \text{ g dw}^{-1}$) and $95\% \pm 11.8\%$ ($1.9 \mu\text{mol CH}_4 \text{ g dw}^{-1}$), respectively, of the methane accumulation of the control compost material. To determine the influence of desiccation stress on the methane production, we simulated desiccation of the compost material by wind for a time span of 5.25 h. During the drying procedure the material dried from 72.3% to 11.9% gravimetric water content. Compared to the untreated compost material, methane production from dried, remoistened compost showed an increased methane production potential (Fig. 3). The methane production rate (calculated between 5.5 and 11 h of incubation) of untreated compost material was $0.015 \pm 0.0014 \mu\text{mol CH}_4 \text{ g dw}^{-1} \text{ h}^{-1}$, whereas methane production rates of compost material dried for 1.5, 3.5 and 5.25 h were 0.026 ± 0.0013 , 0.035 ± 0.002 and $0.028 \pm 0.002 \mu\text{mol CH}_4 \text{ g dw}^{-1} \text{ h}^{-1}$, respectively.

To examine the release of thermophilic methanogens into the air during the processing of compost material, we incubated loaded gelatine filters anoxically in *M. thermophila* specific medium. All bioaerosols collected at the composting plant showed a significant methane production potential at an incubation temperature of 50 °C (Fig. 4A). The methane mixing ratios in the headspace of the incubation vessels rose with time and, after 5 days, concentrations of 28,000 to 35,000 ppmv methane were detectable. The molecular analysis of one bioaerosol, collected from the CC composting plant during the turning of an 11-week-old pile, confirmed these results. The band pattern of the bioaerosol showed five predominant bands which, amongst others, also appeared in the pattern of the compost material from the turned heap (Fig. 4B). The investigations of the control filters, loaded at a 1 km distance from the composting plant, showed no methane

**Fig. 3.** Time course of the methane concentration during compost incubation experiments under anoxic conditions at 50 °C. Compost was sampled from a mature CC compost pile. The material was flushed with air for different time spans and remoistened before incubation. Values are means of triplicates \pm SD.

production potential of these bioaerosols and no PCR product with archaeal specific primers.

To document the persistence of compost-borne thermophilic methanogens in a meadow soil, we measured the potential methane production of compost, soil and soil/compost mixture at six different time points after amendment to the meadow. While no methane production was observed in the pure soil incubations at 50 °C, the compost and the soil/compost mixture incubations showed a clear methane accumulation after 24 h of anoxic incubation (Fig. 5). With increasing duration of samples in the meadow soil, the amount of accumulated methane clearly decreased. The amount of accumulated methane after 24 h in compost material incubations decreased from $53.8 \mu\text{mol CH}_4 \text{ g dw}^{-1}$ at the first sampling date, to $0.4 \mu\text{mol CH}_4 \text{ g dw}^{-1}$ at day 328 after application. During the same period, the

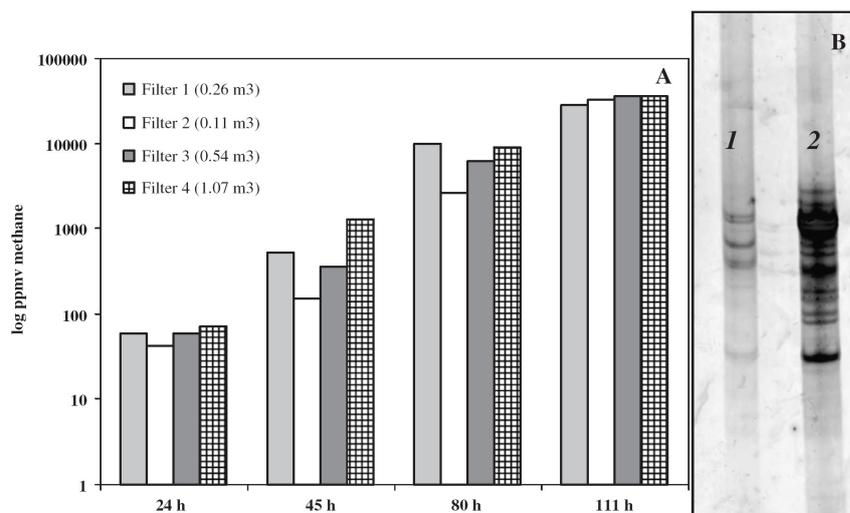


Fig. 4. A Methane mixing ratios at different time points in the headspaces of the anoxic incubations of filters loaded with bioaerosols in *Methanosarcina* specific medium at 50 °C. Bioaerosols were collected during the turning of a 13 week old pile (Filter 2), a 10 week old pile (Filter 1), and two 4 week old piles (Filter 3 and 4) from the CC composting plant. The amount of filtered air is given in parenthesis. Values result from relevant specifications. (B) PCR-SSCP profiles of a bioaerosol (1), collected during the turning of an 11 week old pile, and the corresponding compost material (2), generated with archaeal specific primers A112rf/x036r-PH.

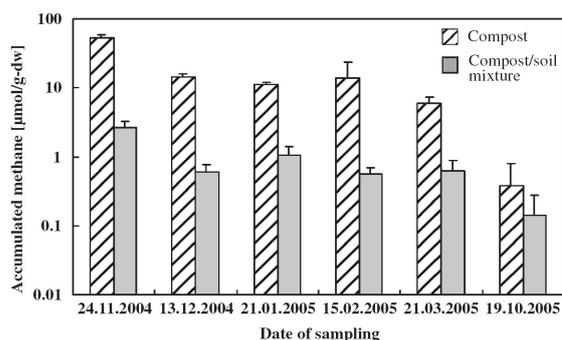


Fig. 5. Accumulated methane in samples of compost (mature CC), compost/soil mixtures and soil (not detectable), after 24 h of anoxic incubation at 50 °C as a function of sampling time. Values are means of triplicates \pm SD.

methane that was produced in the soil/compost mixture incubations decreased from 2.6 to 0.1 $\mu\text{mol CH}_4 \text{ g dw}^{-1}$ (Fig. 5). In addition, arable soil fertilised regularly with CC compost during the previous 10 years was investigated with respect to the methane production potential. After 24 h, a clear methane production could be observed in the samples at 50 and 60 °C, which resulted in production rates of 0.025 and 0.006 $\mu\text{mol CH}_4 \text{ g dw}^{-1} \text{ h}^{-1}$, respectively. At 36 °C, the rate was reduced to 0.002 $\mu\text{mol CH}_4 \text{ g dw}^{-1} \text{ h}^{-1}$. After 10 days, the control soil, fertilised in a conventional way, showed methanogenic activity as well (data not shown).

Discussion

The observed thermophilic methane production in all eight investigated compost materials indicates that thermophilic methanogens are ubiquitously present in compost (Table 1). This finding confirms earlier studies of compost in which high methane emissions during the composting process [5,18–21] and thermophilic methanogens in the compost material have been detected [8,39]. Recently, we identified thermophilic methanogens in compost material, and found that *Methanothermobacter* sp., *M. thermophila* and also members of Rice cluster I, III and IV were present in material from a municipal composting plant [39]. In the present study, the SSCP fingerprints of eight different compost materials supported the assumption that thermophilic methanogens are abundant in compost (Fig. 2). In particular, the presence of *Methanosarcina* sp. in all materials was distinct. The SSCP pattern of the pure culture of *M. thermophila* (Fig. 1) shows the same three bands as the one appearing in the compost material. The reason for the presence of multiple bands may be the number of 16S rRNA operons in the genome of the species. It is known that members of the genus *Methanosarcina* have three operons (<http://rrndb.cme.msu.edu/rrndb/servlet/controller>), which may form different secondary structures during SSCP analysis, resulting in multiple bands formed by only one species. In contrast, sequencing indicated that more sequences than single bands contributed to the SSCP profiles, which is a well-known phenomenon also

observed in the study of Sekiguchi et al. [35]. However, two bands of the SSCP profile contained single stranded DNA from relatives of the *M. thermophilus* species, a thermophilic member of the family *Methanomicrobium*, which could not be detected by cloning analyses in the previous study [39]. With a growth optimum of 55 °C [15] this species finds optimal conditions in compost heaps. The optimum methane production in the different materials took place in the same temperature span. Six materials showed optimal methanogenic activity at 50 °C, whereas only two materials, TC and AC, which showed the highest production rates of all eight samples, had their optimum at 65 °C. These two are the only materials with biowaste as exclusive basic raw material (Table 1).

However, thermophilic methanogens cannot only be found in hot habitats such as composts, oilfields, thermophilic granular sludge or hydrothermal vents in deep sea or oceanic sediments [22,30,39,46], since they also seem to exist in temperate or even cold environments. Yao and Conrad [46] and Fey et al. [13] found methane production at 50 °C in different paddy soils. Nozhevnikova et al. [29] detected thermophilic methane production at 70 °C in deep cold lakes. Wu et al. [45] showed that next to paddy soils riparian soils may also function as a habitat for thermophilic methanogens. The origin of thermophilic organisms in psychrophilic and mesophilic environments is still unclear. Bonjour et al. [6] discussed the distribution of thermophilic microorganisms via air from volcanic habitats. In addition, during the processing of compost and during the fertilisation process of agricultural soils, high amounts of microorganisms are released into the air. Albrecht et al. [1], for instance, showed that the concentrations during heap turning range between 10^6 and 10^8 cells m^{-3} air. Since the amount of *Archaea* in compost material is assumed to be 0.01–0.1% of total microorganisms [39], a number of 10^3 – 10^5 archaeal cells m^{-3} of air during pile processing can be expected. In the present study, such a release of thermophilic *Archaea* into the air is indicated by the high similarity of PCR-SSCP fingerprints from compost material and the corresponding bioaerosol (Fig. 4B) on the one hand, and, on the other hand, by the methane production detected at 50 °C in a medium inoculated with bioaerosols sampled next to the compost pile (Fig. 4A).

It is clear that a distribution of methanogens via air is only possible if the cells survive the desiccation stress during the transport process. Therefore, we simulated this effect in the laboratory. After the oxidic drying of compost material (to 11.9% gravimetric water content), the methanogenic activity in the rewetted compost was easily inducible at 50 °C. Compared to fresh compost material, the methane production rate in this experiment was even slightly enhanced (Fig. 3), an effect which we also found earlier in similar experiments (data not

published). This result clearly shows that a considerable number of methanogens survived this stress simulation, may be because of the attachment to compost particles, as described by Wagner et al. [41].

Beside the distribution of moderate thermophilic methanogens by air, we have to consider their distribution by fertilisation. The main application of compost is its recycling through the soil–plant system, and therefore the annual 4.5 mio t of compost produced in Germany are mainly applied as soil amendment to agricultural soils (www.BMU.de). These anthropogenic activities influence the microbial community structure and diversity in the fertilised soil [32,33]. A recently published study of Gattinger and colleagues [16] showed that cattle manure fertilisation serves as an inoculum for species of *Methanoculleus* and *Methanosarcina* in arable soil. To investigate the persistence of thermophilic methanogens introduced to soil by compost fertilisation, we amended compost to a meadow soil and measured the potential methane production after different times. In contrast to the soil samples, compost and soil/compost mixtures showed thermophilic methane production activity at 50 °C during the first 24 h of incubation, independently of the residence time in the meadow soil. Even after 1 year, all samples containing compost showed a clear thermophilic methane production at 50 °C (Fig. 5). Comparable to the pot experiment, in the analysed arable soil (the farmer amended 10 t compost ha^{-1} and year for 10 years) we also observed a significant methane accumulation after 24 h of incubation at 50 °C. This indicates a thermophilic methanogenic population that is (i) rapidly inducible and (ii) large enough to produce detectable amounts of methane. The fact that the control soil from an adjacent acre showed methane production after some days of lag phase is also a hint of the presence of a small thermophilic methanogenic population in this soil.

We assumed that both distribution mechanisms, air and fertilisation, may affect the methanogens by the lethal effect of natural UV radiation. However, after UV treatment of the compost material, no clear difference in the methane production potential of the radiated compost and the control compost at 50 °C could be observed (data not shown). This indicates that methanogens seem to be protected by the compost particles. These results are comparable with earlier studies, for instance, by Cockell et al. [7] who showed that a 500 μm covering could reduce spore inactivation by UV radiation by at least 50 times and Mancinelli and Klovstad [27] who stated that a dust layer of 1 mm thickness completely prevents spore inactivation at 12 kJ radiation.

The present study shows that compost harbours moderate thermophilic methanogens independently of the processing and origin of the applied organic waste material. Thermophilic methanogens attached to

compost material seem to be resistant against UV-radiation and desiccation. As a consequence, the increasing compost-industry has to be regarded as a source for distribution of moderate thermophilic methanogens via air and fertilisation to temperate soils.

Acknowledgement

We thank Kerstin Fallschissel and Nicole Lodders for useful advice to improve the quality of this article.

References

- [1] A. Albrecht, R. Witzemberger, U. Bernzen, P. Kämpfer, U. Jäckel, Vergleichende Messungen luftgetragener Bakterien mittels Filtration (MD8) und Impingement (AGI 30) in einer Kompostierungsanlage, *Gefahrstoffe Reinhaltung der Luft* 65 (2005) 358–362.
- [2] S.M. Barns, R.E. Fundyga, M.W. Jeffries, N.R. Pace, Remarkable archaeal diversity detected in a Yellowstone National Park hot spring environment, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91 (1994) 1609–1613.
- [3] A.R. Barzegar, A. Yousefi, A. Daryashenas, The effect of addition of different amounts and types of organic materials on soil physical properties and yield of wheat, *Plant Soil* 247 (2002) 295–301.
- [4] B.J. Bassam, G. Caetano-Anolles, P.M. Gresshoff, Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels, *Anal. Biochem.* 196 (1991) 80–83.
- [5] B. Beck-Friis, M. Pell, U. Sonesson, H. Jönsson, H. Kirchmann, Formation and emission of N₂O and CH₄ from compost heaps of organic household waste, *Environ. Monit. Assessm.* 62 (2000) 317–331.
- [6] F. Bonjour, A. Graber, M. Aragno, Isolation of *Bacillus schlegelii*, a thermophilic hydrogen oxidizing, aerobic autotroph, from geothermal and non-geothermal environments, *Microb. Ecol.* 16 (1988) 331–337.
- [7] C.S. Cockell, P. Reffberg, G. Horneck, M. Patel, H. Lamer, C. Cordoba-Jabanero, Ultraviolet protection in microhabitats – lessons from the terrestrial poles applied to mars, in: *Proceedings of the Second European Workshop on Exo/Astrobiology*, Graz, Austria, 2002.
- [8] P.J.L. Derix, G.A.H. de Jong, H.J.M. Op den Camp, C. van der Drift, L.J.L.D. van Griesven, G.D. Vogels, Isolation and characterization of thermophilic methanogenic bacteria from mushroom compost, *FEMS Microbiol. Ecol.* 62 (1989) 251–258.
- [9] A.B. Dohrmann, C.C. Tebbe, Microbial community analysis by PCR-single-strand conformation polymorphism (PCR-SSCP), in: G.A. Kowalchuk, F.J. De Bruijn, I.M. Head, A.D.L. Akkermans, J.D. Van Elsas (Eds.), *Molecular Microbial Ecology Manual*, second ed., Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 2004.
- [10] L. Elsgaard, D. Prieur, G.M. Mukwaya, B.B. Joergensen, Thermophilic sulphate reduction in hydrothermal sediment of lake Tanganyika, East Africa, *Appl. Environ. Microbiol.* 60 (1994) 1473–1480.
- [11] L. Elsgaard, M.F. Isaksen, B.B. Joergensen, A.M. Alayse, H.W. Jannasch, Microbial sulphate reduction in deep-sea sediments at the Guaymas basin-hydrothermal vent area – influence of temperature and substrates, *Geochem. Cosmochim. Acta* 58 (1994) 3335–3343.
- [12] S. Fetzter, F. Bak, R. Conrad, Sensitivity of methanogenic bacteria from paddy soil to oxygen and desiccation, *FEMS Microbiol. Ecol.* 12 (1993) 107–115.
- [13] A. Fey, K.J. Chin, R. Conrad, Thermophilic methanogens in rice field soil, *Environ. Microbiol.* 3 (2001) 295–303.
- [14] E.G. Filcheva, C.D. Tsadilas, Influence of clinoptilolite and compost on soil properties, *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 33 (2002) 595–607.
- [15] G.M. Garrity, J.G. Holt, Euryarchaeota, in: D.R. Boone, R.W. Castenholz (Eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 1, Springer, New York, 2001, pp. 211–354.
- [16] A. Gattinger, M.G. Höfle, M. Schloter, A. Embacher, F. Böhme, J.C. Munch, M. Labrenz, Traditional cattle manure application determines abundance diversity and activity of methanogenic Archaea in arable European soil, *Environ. Microbiol.* 9 (2007) 612–624.
- [17] R. Großkopf, P.H. Janssen, W. Liesack, Diversity and structure of the methanogenic community in anoxic rice paddy soil microcosms as examined by cultivation and direct 16S rRNA gene sequence retrieval, *Appl. Environ. Microbiol.* 64 (1998) 960–969.
- [18] H.J. Hellebrand, Emission of nitrous oxide and other trace gases during composting of grass and green waste, *J. Agric. Eng. Res.* 69 (1998) 365–375.
- [19] B. Hellmann, Freisetzung Klimarelevanter Spurengase in Bereichen mit hoher Akkumulation von Biomassen, Zeller Verlag, Osnabrück, 1995.
- [20] B. Hellmann, L. Zelles, A. Palojärvi, Q. Bai, Emission of climate-relevant trace gases and succession of microbial communities during open-window composting, *Appl. Environ. Microbiol.* 63 (1997) 1011–1018.
- [21] U. Jäckel, K. Thummes, P. Kämpfer, Thermophilic methane production and oxidation in compost, *FEMS Microbiol. Ecol.* 52 (2005) 175–184.
- [22] C. Jeanthon, Molecular ecology of hydrothermal vent microbial communities, *Ant. V. Leeuwenhoek.* 77 (2000) 117–137.
- [23] B.B. Joergensen, M.F. Isaksen, H.W. Jannasch, Bacterial sulphate reduction above 100 °C in deep-sea hydrothermal vent sediments, *Science* 258 (1992) 1756–1757.
- [24] A. Kiener, T. Leisinger, Oxygen sensitivity of methanogenic bacteria, *Syst. Appl. Microbiol.* 4 (1983) 305–312.
- [25] J.K. Krisjansson, K.O. Stetter, Thermophilic bacteria, in: J.K. Kristjansson (Ed.), *Thermophilic Bacteria*, CRC Press Inc., Boca Raton, 1992, pp. 1–18.
- [26] M. Leclerc, J.-P. Delgenes, J.-J. Godon, Diversity of the archaeal community in 44 anaerobic digesters as determined by single strand conformation polymorphism analysis and 16S rDNA sequencing, *Environ. Microbiol.* 6 (2004) 809–819.
- [27] R.L. Mancinelli, M. Klovstad, Martian soil and UV radiation: microbial viability assessment on spacecraft surfaces, *Planet Space Sci.* 48 (2000) 1093–1097.

- [28] M.I.M. Banat, T.J. Rahman, M. Berzano, The frequency and characteristics of highly thermophilic bacteria in cool soil environments, *Environ. Microb.* 4 (2002) 595–602.
- [29] A.N. Nozhevnikova, C. Holliger, A. Ammann, A.J.B. Zehnder, Methanogenesis in sediments from deep lakes at different temperatures (12–70 °C), *Water Sci. Tech.* 36 (1997) 57–64.
- [30] V.J. Orphan, L.T. Taylor, D. Hafenbradl, E.F. DeLong, Culture-dependent and culture-independent characterization of microbial assemblages associated with high temperature petroleum reservoirs, *Appl. Environ. Microbiol.* 66 (2000) 700–711.
- [31] V. Peters, R. Conrad, Methanogenic and other strictly anaerobic bacteria in desert soil and other oxic soils, *Appl. Environ. Microbiol.* 61 (1995) 1673–1676.
- [32] M. Ros, J.A. Pascual, C. Garcia, M.T. Hernandez, H. Insam, Hydrolase activities, microbial biomass and bacterial community in a soil after long-term amendment with different composts, *Soil Biol. Biochem.* 38 (2006) 3443–3452.
- [33] C. Saison, V. Degrange, R. Oliver, P. Millard, C. Commeaux, D. Montange, X. Le Roux, Alteration and resilience of soil microbial community following compost amendment: effects of compost level and compost-borne microbial community, *Environ. Microbiol.* 8 (2006) 247–257.
- [34] J. Sambrook, D.W. Russel, *Molecular Cloning – A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2001.
- [35] H. Sekiguchi, N. Tomioka, T. Nakahara, H. Uchiyama, A single band does not always represent single bacterial strains in denaturing gradient gel electrophoresis analysis, *Biotechnol. Lett.* 23 (2001) 1205–1208.
- [36] Y. Sekiguchi, Y. Kamagata, K. Syutsubo, A. Ohashi, H. Hrada, K. Nakamura, Phylogenetic diversity of mesophilic and thermophilic granular sludges determined by 16S rRNA gene analysis, *Microbiology* 144 (1998) 2655–2665.
- [37] S.M. Sievert, J. Kuever, G. Muyzer, Identification of 16S ribosomal DNA-defined bacterial populations at a shallow submarine hydrothermal vent near Milos Island (Greece), *Appl. Environ. Microbiol.* 66 (2000) 3102–3109.
- [38] K.O. Stetter, Hyperthermophilic prokaryotes, *FEMS Microbiol. Rev.* 18 (1996) 149–158.
- [39] K. Thummes, P. Kämpfer, U. Jäckel, Temporal change of composition and potential activity of the thermophilic archaeal community during the composting of organic material, *Syst. Appl. Microbiol.* (2007) PMID: 17336478.
- [40] J.B. Van Lier, J.L.S. Martin, G. Lettinga, Effect of temperature on the anaerobic thermophilic conversion of volatile fatty acids by dispersed and granular sludge, *Water Res.* 30 (1996) 199–207.
- [41] D. Wagner, E.M. Pfeiffer, E. Bock, Methane production in aerated marshland and model soils: effects of microflora and soil texture, *Soil Microbiol. Biochem.* 31 (1999) 999–1006.
- [42] F. Widdel, F. Bak, Gram-negative mesophilic sulfate-reducing bacteria, in: M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer, E. Stackebrandt (Eds.), *The Prokaryotes*, Electronic edition, Springer, New York, 1992.
- [43] J. Wiegand, Temperature spans for growth: hypothesis and discussion, *FEMS Microbiol. Rev.* 75 (1990) 155–170.
- [44] K. Wiemer, M. Kern, *Biologische Abfallbehandlung*, M.I.C. Baeza, Witzhausen, 1993.
- [45] X.L. Wu, M.W. Friedrich, R. Conrad, Diversity and ubiquity of thermophilic methanogenic Archaea in temperate anoxic soils, *Environ. Microb.* 8 (2005) 394–404.
- [46] H. Yao, R. Conrad, Effect of temperature on reduction of iron and production of carbon dioxide and methane in anoxic wetland rice soils, *Biol. Fertil. Soils* 30 (2000) 135–141.

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Dr.-Ing. Peter Kämpfer für die Stellung des Themas und die Betreuung während meiner Doktorarbeit sowie für die gewährten Freiräume.

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. Hans-Jürgen Jäger für die Begutachtung der Arbeit.

Bei Herrn Prof. Dr. Sven Schubert und Herrn Prof. Dr. Stefan Gäth möchte ich mich für die Bereitstellung als Prüfer meiner Disputation bedanken.

Für die engagierte Betreuung dieser Arbeit im praktischen und theoretischen Bereich, seine moralische Unterstützung und sein großes Interesse geht ein herzliches Dankeschön an Herrn Dr. Udo Jäckel. Er durfte alle Höhen und Tiefen miterleben und hat zu einem großen Anteil dazu beigetragen, dass diese Arbeit geschrieben wurde.

Ein großes Dankeschön gilt allen Mitarbeitern der Kompostierungsanlage für die Flexibilität und geduldige Beantwortung meiner Fragen.

Frau Mag. Brigitte Knapp vom Institut für Mikrobiologie der Universität Innsbruck danke ich für die Zusammenarbeit sowie die Probennahme und Zusendung der Bodenproben aus Linz.

Der feinmechanischen Werkstatt der Physikalischen Institute danke ich für die kompetente Hilfe beim Entwurf der Bodensonde sowie für ihre Konstruktion.

Mein Dank gilt der gesamten Arbeitsgruppe der Angewandten Mikrobiologie für die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre, im Besonderen meinen lieben Kolleginnen Kerstin Fallschissel und Jenny Schäfer, welche mir nicht nur wissenschaftlich stets mit Rat und Tat zur Seite standen. Gerade in der Phase meiner Schwangerschaft haben beide zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen und stets ein aufmunterndes Wort für mich gehabt. Frau Rita Geißler-Plaum möchte ich für die kompetente Hilfe bei den Bodenanalysen danken, Frau Gundula Will für die guten Tipps und Ratschläge. Ganz herzlich gedankt sei auch Herrn Dr. Stefan Ratering für die Hilfe bei der Gaschromatographie und bei der Lösung einiger wissenschaftlicher Fragestellungen.

Bei den Probennahmen waren mir Rita Geißler-Plaum, Kerstin Fallschissel, Jenny Schäfer, Kristina Schauß, meine lieben Eltern und Tobi, bewaffnet mit Bohrstock und Eimer, eine unverzichtbare Hilfe. Rosemarie und Horst Meister danke ich für die freundliche Überlassung ihres Kompostes.

Udo, Kerstin, Tobi, meinen Eltern und meiner Schwester sei gedankt für die konstruktive Kritik und die stilistischen und orthografischen Korrekturvorschläge.

Allen lieben Freundinnen, die mich während dieser Zeit unterstützt haben, möchte ich ebenfalls danken. Meiner lieben Schwester Kristina danke ich für das Verständnis und den Rückhalt, den sie mir stets gegeben hat.

Ganz besonders danke ich Tobi und meinem kleinen Emil für die Liebe und Unterstützung in allen Lebenslagen.

Meinen lieben Eltern möchte ich dafür danken, dass sie mir das Studium und diese Doktorarbeit ermöglicht haben und meine wissenschaftlichen Aktivitäten stets mit Geduld und Wohlwollen aus der Entfernung und von nebenan verfolgt haben.

Erklärung

Ich erkläre:

Ich habe die vorgelegte Dissertation

**Thermophile methanogene *Archaea* in Kompost:
Zeitliche Veränderung der Populationszusammensetzung, potentielle Aktivität und
Verbreitung**

selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Gießen, den

Kathrin Thummes