



Doctoral Thesis

Activity and diversity of nitrogen-fixing microorganisms novel tools to characterize populations in soil

Author(s):

Bürgmann, Helmut

Publication Date:

2003

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-004568036> →

Rights / License:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

DISS. ETH NO. 15127

**ACTIVITY AND DIVERSITY OF NITROGEN-FIXING
MICROORGANISMS:
NOVEL TOOLS TO CHARACTERIZE POPULATIONS IN
SOIL**

A dissertation submitted to the
SWISS FEDERAL INSTITUT OF TECHNOLOGY ZURICH

for the degree of

Doctor of Sciences

presented by

HELMUT BÜRGMANN

Dipl.-Geoökol. Univ., Universität Bayreuth

Born September 4, 1971

citizen of Germany

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. J. Zeyer, examiner

Prof. Dr. H. Hennecke, co-examiner

Dr. F. Widmer, co-examiner

2003

SUMMARY

Free-living nitrogen-fixing microorganisms (diazotrophs) are ubiquitous in soil and are important contributors to the nitrogen-input of many terrestrial ecosystems. The study of these organisms and their ecological significance requires methods for the assessment of their diversity and activity. Molecular methods have become increasingly important for the study of microbial diversity, but their use for the study of the activity of soil microbial communities is still in its infancy.

In the frame of this thesis, a number of methods for the description of the diversity of free-living diazotrophs have been developed and improved to provide links between diazotroph community structures and activities. The approach used was based on the extraction of nucleic acids and the sensitive PCR detection of the nitrogenase reductase gene (*nifH*), which served as a marker gene for potential diazotrophs. Furthermore, reverse transcription PCR was used to detect *nifH* mRNA transcripts in soil, which served as a marker for active diazotrophs. The amplified sequences were subsequently studied with molecular fingerprinting methods and sequencing.

In order to provide a robust basis for subsequent molecular analyses, a highly efficient nucleic acid extraction protocol and a high-stringency RNA purification protocol were developed. The influences of different parameters of the bead-beating extraction protocol were evaluated and a new approach was developed to increase extraction efficiency. Furthermore, a method to assess total DNA contents of soil using multiple high-intensity extractions was proposed. This method provided a solid base for all downstream molecular analyses. The RNA purification protocol was based on DNase treatment and acid phenol extraction in order to obtain highly pure total RNA, which was free of DNA contamination. These extracts allowed for the use of highly sensitive reverse transcription PCR for the detection of *nifH* mRNA.

The power of PCR-based *nifH* detection was improved by an innovative "locked primer site" approach. This method allowed for selective amplification of *nifH* from different groups of diazotrophs with a set of PCR protocols that all target the same gene fragment. The protocols were tested and optimized using pure cultures of diazotroph reference strains, and subsequently applied to the analysis of six different soils. The approach allowed for a focused amplification of *nifH* from different groups of diazotrophs and improved the detection of less abundant diazotrophs in soils. Fingerprinting analyses of PCR products obtained from soil DNA extracts revealed that the new *nifH* PCR protocols differentiated better between the

diazotroph populations in different soils than previously used universal amplification protocols.

By combining these methods, a detection protocol for *nifH* mRNA in soil was developed. The high sensitivity of this protocol allowed for the detection and analysis of *nifH* mRNA in soil. The developed methodology was applied to study transcription of *nifH* in *Azotobacter vinelandii* growing in sterilized soil microcosms in the presence of an additional carbon source. Treatments with nitrogen limiting conditions resulted in strong N-fixation activity while nitrogen excess suppressed nitrogen-fixation. Clear effects of the nitrogen treatment on the ratio of *nifH* mRNA to total RNA could be shown. Furthermore, the mRNA data was significantly correlated with measurements of nitrogen-fixation activity and cell density.

The results presented in this thesis have shown that monitoring of *nifH* mRNA in soil is a suitable and promising approach to link population structures and activities of diazotroph communities. The developed methodology can be used to study the dynamics of microbial communities *in situ*, in much greater detail than previously possible. The study of mRNA expression in soils offers the opportunity to identify key players in symbiotic nitrogen-fixation, to study short-term community responses in changing environments, or to analyze the effect of regulation *in situ*. Furthermore, the methods for RNA extraction and purification provide a robust basis for expression studies of other functional genes in the soil environment.

ZUSAMMENFASSUNG

Freilebende stickstofffixierende Bakterien kommen in allen terrestrischen Ökosystemen vor. Sie spielen eine wichtige Rolle im Stickstoffhaushalt vieler terrestrischer Ökosysteme. Für die wissenschaftliche Untersuchung dieser Organismen und ihrer ökologischen Bedeutung bedarf es geeigneter Methoden zur Analyse ihrer Diversität und Aktivität. Molekulare Methoden für die Untersuchung von mikrobieller Diversität sind bereits weitgehend etabliert. Molekularbiologische Techniken zur Analyse von mikrobiologischen Prozessen in Bodenökosystemen befinden sich dagegen noch in der Entwicklung.

Im Rahmen dieser Dissertation wurden neue Methoden zur Analyse der Populationsstruktur freilebender stickstofffixierender Mikroorganismen entwickelt oder verbessert. Dabei lag das Hauptaugenmerk auf der Entwicklung von Methoden, die es erlauben, eine Verbindung zwischen Populationsstruktur und Aktivität herzustellen, d.h. die Gesamtaktivität individuellen Populationen oder Organismen zuzuordnen. Der verwendete Ansatz beruhte auf der Extraktion von Nukleinsäuren aus dem Boden und dem spezifischen Nachweis der Gensequenz für das Enzym Nitrogenase Reduktase (*nifH*). Anhand dieses Gens lassen sich potentielle Stickstofffixierer mit Hilfe von PCR (Polymerase Kettenreaktion) nachweisen. Nur aktive Stickstofffixierer transkribieren *nifH* mRNA in grösseren Mengen. Diese eignet sich daher als molekularer Marker für aktive Stickstofffixierung. Der Nachweis der mRNA erfolgte durch reverse Transkription und anschliessende PCR. Die amplifizierten Gensequenzen lassen sich anschliessend anhand von „genetischen Fingerabdrücken“ oder Sequenzierung untersuchen.

Als Voraussetzung für weiterführende Analysen wurde zunächst eine hocheffiziente Methode zur Nukleinsäureextraktion aus Boden entwickelt. Anschliessend wurde eine stringente Methode zur Aufreinigung von RNA aus diesen Extrakten entwickelt. Durch die Kombination einer Behandlung mit DNase und der Extraktion mit saurem Phenol wurde ein RNA-Extrakt mit sehr geringer DNA-Kontamination erhalten. Dies schaffte die Voraussetzung für den Nachweis von *nifH* mRNA in diesen Extrakten mittels hochsensitiver PCR Amplifikation.

Zur Verbesserung und Erweiterung des auf PCR basierenden Nachweises von *nifH*-Sequenzen wurde ein neuartiger Ansatz gewählt. Es wurden mehrere Sets von PCR-Primern entwickelt, welche alle dasselbe Genfragment amplifizieren, dabei aber selektiv sind für unterschiedliche Gruppen von Stickstofffixierern. Diese Methoden wurden zunächst an stickstofffixierenden Reinkulturen getestet und anschliessend zur Analyse von Boden-DNA

eingesetzt. Es konnte gezeigt werden, dass die neuen Primer *nifH* von unterschiedlichen Untergruppen von Stickstofffixierern aus Boden-DNA amplifizieren. Dies ermöglicht die Detektion von Stickstofffixierern mit geringer Abundanz. Zudem erlauben genetische Fingerabdrücke, die mit den neuen PCR-Protokollen gewonnen werden, eine verbesserte Analyse von Populationsunterschieden im Boden im Vergleich zu bisherigen „universellen“ PCR Protokollen.

Die Kombination dieser Methoden war die Voraussetzung für die Entwicklung einer Nachweismethode für *nifH* mRNA im Boden. Diese Methode erwies sich als sehr sensitiv, und eignete sich für den Nachweis von *nifH* mRNA in natürlichen Böden und in Boden-Mikrokosmen im Labor. Anschliessend wurde diese Technik eingesetzt, um die Transkription von *nifH* durch *Azotobacter vinelandii* in sterilisiertem Boden zu untersuchen. Im Versuch zeigten Versuchsansätze mit Stickstoffsättigung keine Stickstofffixierungs-Aktivität, wohingegen bei Stickstoffmangel hohe Aktivität gemessen wurden. Entsprechend konnte ein deutlicher Einfluss des Stickstoffangebotes auf die Transkription von *nifH* festgestellt werden. Die gemessene relative *nifH* mRNA Konzentration korrelierte dabei signifikant mit der gemessenen Stickstofffixierungs-Aktivität.

Die Resultate zeigen, dass die Analyse von *nifH* mRNA im Boden einen viel versprechenden Ansatz zur Untersuchung spezifischer Stickstofffixierungs-Aktivitäten darstellt. Der entwickelte Ansatz ermöglicht eine weitaus detailliertere Analyse der Dynamik von Mikrobengemeinschaften im Boden als bisher. Der Ansatz eignet sich zum Beispiel für die Identifikation von wichtigen freilebenden Stickstofffixierern, für die Untersuchung von kurzfristigen Reaktionen auf Veränderungen der Umweltbedingungen, oder für die Analyse der Auswirkungen von Regulationsmechanismen *in situ*. Die entwickelte Methode für Extraktion und Aufreinigung von RNA aus Boden stellt darüber hinaus auch für den Nachweis anderer funktioneller Gene eine solide Grundlage dar.