



## Doctoral Thesis

# **Nitrogen dynamics in floodplain soils and development and application of a novel method for the $\sigma^{15}\text{N}$ and $\sigma^{18}\text{O}$ analysis of nitrate from freshwater**

**Author(s):**

Huber, Benjamin

**Publication Date:**

2012

**Permanent Link:**

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-007309208> →

**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. 20269

**Nitrogen dynamics in floodplain soils and development and  
application of a novel method for the  $\delta^{15}\text{N}$  and  $\delta^{18}\text{O}$  analysis of  
nitrate from freshwater**

A dissertation submitted to

ETH ZURICH

for the degree of

Doctor of Sciences

presented by

BENJAMIN HUBER

Dipl. Natw. ETH

born 28<sup>th</sup> August, 1976

citizen of Winterthur ZH and Uesslingen-Buch TG

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Stefano M. Bernasconi

Dr. Elisabeth Graf Pannatier

Dr. Jörg Luster

Prof. Dr. Bernhard Wehrli

PD Dr. Werner Borcken

2012

---

## Summary

During the last two centuries, humans have greatly altered the global nitrogen cycle by the production and use of nitrogen containing fertilizers, and by the combustion of fossil fuels. This excess of reactive nitrogen has led to nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ) contamination of the drinking water in many regions of the world. The importance of riparian zones in reducing nitrate inputs from adjacent agricultural land to surface and groundwater is well known. However, most studies investigated either the topsoil or the groundwater and the soil column has been considered as a black box. Only a limited number of studies looked at the soil solution, which links these two compartments, to assess N transformation along its flow path.

Therefore, the overall goal of this PhD thesis was to gain a better understanding of nitrogen dynamics in floodplain soils by monitoring nitrate concentrations and  $\delta^{15}\text{N}$  and  $\delta^{18}\text{O}$  of nitrate in soil solutions in the soil column. The steps taken towards this objective were: i) Development of simple and broadly applicable techniques for the online isotope ratio measurements of  $\delta^{15}\text{N}$  and  $\delta^{18}\text{O}$  in nitrate. ii) Assessment of nitrogen transformations and apportionment of nitrate sources by the application of these methods on soil solutions. iii) Creation of a nitrogen balance for the floodplain soils in order to evaluate whether they are a nitrogen sink or source. The study was carried out in a short-hydroperiod floodplain of the Thur River (NE Switzerland).

The first method developed in this work allows the measurement of both  $\delta^{15}\text{N}$  and  $\delta^{18}\text{O}$  in nitrate for samples containing at least  $20 \mu\text{mol NO}_3^-$ . The “acetone method” is based on the different solubilities of inorganic salts in an acetone-hexane-water mixture. In this solvent all major nitrate salts are soluble, whereas all other oxygen-bearing compounds such as most inorganic carbonates, sulfates, and phosphates are not. Using this ternary solvent, nitrate is first extracted from a freeze-dried salt bulk and subsequently precipitated as anhydrous barium nitrate by adding barium iodide. The method was evaluated using natural freshwater solutions amended with international certified nitrate standards with known N and O isotopic signatures.

The second method allows the  $\delta^{15}\text{N}$  analysis of nitrate and was developed for samples with small nitrate amounts ( $\geq 4 \mu\text{mol}$ ) and high dissolved organic matter (DOM) contents. The “two-phase method” is based on the fact that concentrated NaOH solution and pure acetone are immiscible. First, nitrate and DOM are extracted from a freeze-dried sample bulk by using concentrated sodium hydroxide. After the addition of acetone two liquid

layers are formed, and H<sub>2</sub>O and NO<sub>3</sub><sup>-</sup> migrate into the acetone layer whereas DOM remains in the highly polar hydroxide solution. With this novel technique up to 99% of DOM could be removed from river water and soil solutions assuring that no interference from organic N on the δ<sup>15</sup>N signature of nitrate occurs.

Nitrate concentrations and stable isotopes in soil solutions from the riparian forest revealed that most of the nitrate was microbially produced. Denitrification played a subordinated role and was only visible during flooding in deeper soil layers close to the aquifer. Furthermore, because in our soils archaeal ammonia oxidizers (AOA) are more abundant than their bacterial counterparts (AOB), the O isotope systematics for nitrate produced over the archaeal ammonia oxidation could be deciphered. It was found that 85% of the oxygen atoms in newly formed nitrate were mainly derived from the surrounding water. This is higher than reported for AOB (67–75%) and higher than expected for the archaeal nitrification based on the stoichiometry (67%). This difference can most likely be attributed to an enhanced intracellular O-exchange (>50%) between one of the intermediary products (NH<sub>2</sub>OH, HNO) or NO<sub>2</sub><sup>-</sup> and H<sub>2</sub>O during archaeal ammonia oxidation.

The nitrogen balance of the floodplain soils revealed that, due to high sedimentation rates, frequently inundated zones retain large amounts of nitrogen, and overall act as a N sink. In contrast, in the mature riparian forest, as a result of high net nitrification rates and large soil nitrogen pools that have been accumulated over time, nitrate leaching exceeds total nitrogen input most of the time, and thus acts as a N source. Main factor explaining the differences in nitrate concentrations was the variability in soil texture and field capacity (FC). In fine-grained subsoils with high FCs and volumetric water contents near FC, high nitrate concentrations were observed, often exceeding the Swiss and EU groundwater quality criteria of 400 and 800 μmol L<sup>-1</sup>, respectively. As a consequence, nitrate leaching from the unsaturated zone into groundwater led to a significant nitrate contribution during flood events and in winter when soil water fluxes were high.

The findings of this thesis are of great interest for scientists as well as for water quality managers: i) The development of an efficient and simple sample preparation technique for the δ<sup>15</sup>N and δ<sup>18</sup>O analysis of nitrate in natural waters made the dual isotope approach more accessible. Up to now, only a limited number of laboratories worldwide was able to perform these analyses. ii) This is the first study showing *in-situ* isotopic signatures of microbially produced nitrate from soils dominated by ammonia-oxidizing archaea (AOA).

Because AOA genes are ubiquitous in terrestrial and marine environments, these findings contribute to a better fundamental understanding of nitrification and will help to improve the interpretation of the oxygen isotope signature of nitrate. iii) The common opinion that floodplain soils represent important nitrogen sinks has to be revised. The capacity of floodplain soils to retain and remove nitrogen depend on several factors such as inundation frequency and duration, nitrate load in the river and groundwater, physicochemical soil properties, soil microbial communities and the ecological succession stage.

## Zusammenfassung

Menschliche Aktivitäten wie intensive Landwirtschaft und Verbrennung fossiler Brennstoffe haben den globalen Stickstoffkreislauf während der letzten beiden Jahrhunderte stark verändert. Der Überschuss an reaktivem Stickstoff (N) hat zu einer erhöhten Nitratbelastung im Trinkwasser in weiten Teilen der Welt geführt. Schwemmebenen von Flüssen und Seen wirken oft als Filter landwirtschaftlichen Eintrages von Nitrat ( $\text{NO}_3^-$ ) in Oberflächen- und Grundwasser. Die meisten Studien haben jedoch entweder nur den Oberboden oder nur das Grundwasser untersucht und die Bodensäule wurde dabei als „Blackbox“ angesehen. Nur wenige Studien fokussierten auf die Bodenlösung, das Bindeglied zwischen diesen beiden Kompartimenten, um Stickstofftransformationen entlang ihres Fliessweges zu untersuchen.

Hauptziel dieser Doktorarbeit war ein verbessertes Verständnis der Stickstoffdynamik in Böden einer Flussaue anhand der Konzentration und der Isotopensignatur ( $\delta^{15}\text{N}$  und  $\delta^{18}\text{O}$ ) von Nitrat in der Bodenlösung. Dieses Zieles wurde in folgenden Teilschritten erreicht: i) Entwicklung von einfachen und vielseitig anwendbaren Probenaufarbeitungs-Methoden für die Messung von  $\delta^{15}\text{N}$  and  $\delta^{18}\text{O}$  in Nitrat; ii) Anwendung dieser Methoden auf die Bodenlösung in einer Flussaue zur Evaluierung dominanter Stickstofftransformationen und der Bestimmung der Herkunft des Nitrats; iii) Erstellung einer Stickstoffbilanz für die untersuchten Auenböden, um zu eruieren, ob diese eine Stickstoffsenke oder Quelle sind. Die Studie wurde in einem renaturierten Flussabschnitt des perialpinen Flusses Thur in der Nordostschweiz durchgeführt und war Teil des interdisziplinären RECORD-Projektes des ETH Bereichs.

Die erste in dieser Arbeit entwickelte Methode erlaubt die kombinierte Analyse von  $\delta^{15}\text{N}$  und  $\delta^{18}\text{O}$  in Nitrat für Wasserproben, welche mindestens  $20 \mu\text{mol NO}_3^-$  enthalten. Die sogenannte „Acetone Method“ beruht auf den Löslichkeitsunterschieden anorganischer Salze in einer Aceton-Hexan-Wasser-Mischung. In diesem Lösungsmittel sind alle natürlich vorkommenden Nitratsalze löslich, während alle anderen Komponenten, welche Sauerstoff enthalten, z.B. Karbonate, Sulfate und Phosphate, unlöslich sind. Mit Hilfe dieses Lösungsmittels werden die Nitratsalze zuerst aus einer gefriergetrockneten Wasserprobe extrahiert und anschliessend durch die Zugabe von Bariumiodid als wasserfreies Bariumnitrat ausgefällt. Testmessreihen mit verschiedenen simulierten Süswasserproben mit bekannten Isotopensignaturen des gelösten Nitrats führten zu genauen und gut reproduzierbaren Ergebnissen.

Die zweite Methode erlaubt die Analyse von  $\delta^{15}\text{N}$  in Nitrat und wurde für Süßwasserproben mit kleinen Nitratmengen ( $\geq 4 \mu\text{mol}$ ) und grossen Anteilen gelöster organischer Stoffe (DOM) entwickelt. Die sogenannte "Two-phase Method" basiert auf der Tatsache, dass konzentrierte Natronlauge und reines Aceton nicht mischbar sind und sich daher eine wässrige und organische Phase bilden. Zuerst wird Nitrat und DOM mit Hilfe von konzentrierter NaOH Lösung aus einer gefriergetrockneten Wasserprobe extrahiert. Bei der anschliessenden Zugabe von Aceton gehen ein Teil des Wassers und das Nitrat in die organische Phase über, während DOM in der stark polaren und alkalischen wässrigen Phase bleibt. Dank dieser neuartigen Separationstechnik, welche es erlaubt bis zu 99% des DOM in Flusswasser und Bodenlösungen zu entfernen, wird eine mögliche Interferenz von organischem Stickstoff auf die  $\delta^{15}\text{N}$  Signatur von Nitrat minimiert.

Aufgrund der Nitratkonzentrationen und der stabilen Isotopen in Bodenlösungen des Auenwaldes konnte gezeigt werden, dass ein Grossteil des Nitrates durch Nitrifikation gebildet wurde. Denitrifikation war weniger stark ausgeprägt und konnte nur während Flut in den tieferen Bodenschichten, d.h. in der Nähe des Grundwasserspiegels beobachtet werden. Im weiteren, aufgrund der Dominanz von Archaeen über Bakterien bei den Ammonium-oxidierenden Mikroorganismen in unseren Auenböden konnte die Herkunft der Sauerstoffatome im Nitrat, welches über den archaealen Oxidationsweg produziert wird, bestimmt werden. Die Sauerstoffe stammen hauptsächlich (85%) vom umliegenden Wasser und zu einem grösseren Anteil, als es aufgrund der Stöchiometrie des Prozesses erwartet würde (67%). Grund für diese Differenz könnte ein erhöhter intrazellulärer Sauerstoffaustausch ( $>50\%$ ) zwischen einem der Zwischenprodukte ( $\text{NH}_2\text{OH}$  oder  $\text{HNO}$ ) und  $\text{H}_2\text{O}$  bzw.  $\text{NO}_2^-$  und  $\text{H}_2\text{O}$  sein. Dieser Austausch scheint typisch für den archaealen Oxidationsprozess zu sein.

Die Stickstoffbilanz für die Auenböden zeigte auf, dass oft geflutete Zonen aufgrund hoher Sedimentationsraten grosse Mengen an organischem Stickstoff einspeichern und deshalb als Stickstoffsенke fungieren. Im Gegensatz dazu wird der Stickstoffeintrag im stabilen Auenwald aufgrund hoher Netto-Nitrifikationsraten oft von der Nitratauswaschung übertroffen und stellt deshalb ein Stickstoffquelle dar. Ausgangsmaterial für die Nitrifikation im Auenwald sind die grossen während Zeiten intensiver Überschwemmungen akkumulierten Mengen organischen Stickstoffs. Insgesamt waren die Variabilität der Bodentextur und der Feldkapazität Hauptursache für die unterschiedlichen Nitratkonzentrationen in den Bodenlösungen. In

Unterböden mit hohen Feldkapazitäten und volumetrischem Wassergehalten nahe der Feldkapazität wurden der Schweizerische und der EU Grenzwert für Nitratkonzentrationen im Grundwasser von 400 und 800  $\mu\text{mol L}^{-1}$  oft überschritten. Als Folge, bei Flut und im Winter, wenn hohe Wasserflüsse gemessen wurden, führte Nitratauswaschung aus der ungesättigten Zone zu einem signifikanten Nitrateintrag ins Grundwasser.

Die Erkenntnisse dieser Doktorarbeit sind von grossem Interesse sowohl für Wissenschaftler als auch für Wasserqualitätsmanager: i) Mit der Entwicklung einer effizienten und einfachen Aufarbeitungs-Methode zur Bestimmung von  $\delta^{15}\text{N}$  und  $\delta^{18}\text{O}$  in Nitrat wurde der „Dual Isotope Approach“ für eine breitere Anwendung zugänglich gemacht. ii) Dies ist die erste Studie, welche *in-situ* Isotopen-Signaturen von Nitrat zeigt, welches über den archaealen Nitrifikationsweg produziert wurde. Da Ammonium-oxidierende Archaeen in terrestrischen und marinen Ökosystemen allgegenwärtig sind, helfen diese Resultate grundlegende Prinzipien der Nitrifikation besser zu verstehen und die Interpretation von  $\delta^{15}\text{N}$  und  $\delta^{18}\text{O}$  in Nitrat zu verbessern. iii) Die allgegenwärtige Meinung, dass Auenböden generell eine Stickstoffsенke darstellen, muss revidiert werden. Die Fähigkeit von Auenböden, Stickstoff zu speichern oder abzubauen hängt von mehreren Faktoren ab, wie zum Beispiel von der hydrologischen Konnektivität, der Nitratbelastung im Fluss- und Grundwasser, den physikochemischen Bodeneigenschaften, den mikrobiellen Gemeinschaften und dem ökologischen Entwicklungsstadium.