



Doctoral Thesis

Microbial nitrogen cycling in soils at pioneer sites

Author(s):

Brankatschk, Robert

Publication Date:

2012

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-007580097> →

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. 20402

**MICROBIAL NITROGEN CYCLING
IN SOILS AT PIONEER SITES**

A dissertation submitted to

ETH ZURICH

for the degree of

Doctor of Sciences

presented by

ROBERT BRANKATSCHK

Diplom Geoökologe, Technische Universität Bergakademie Freiberg

Master of Science in Ecology and Environment, Lancaster University

Born 3 September 1982

Citizen of Germany

Accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Josef Zeyer, examiner

Prof. Dr. Michael Schloter, co-examiner

Dr. Anna Lazzaro, co-examiner

2012

Summary

Pioneer sites such as the forefields of receding glaciers, mobile sand dunes, and volcanic lava flows, represent ideal environments to study the development of terrestrial ecosystems. Pioneer sites are characterised by scarce vegetation and low nutrient content. Nitrogen (N) is virtually absent in soils at pioneer sites as it is not part of the minerals in the bedrock. Over the years N accumulates and plants colonise these systems, indicating development of the N cycle. Some processes within the N cycle are solely catalysed by archaea, bacteria, and fungi; therefore, microorganisms are essential to the N cycle in soil.

The first objective of this dissertation was to study the development of the N cycle in pioneer soils. Two contrasting pioneer sites were chosen; the forefield of the retreating Damma Glacier in canton Uri, Switzerland and a mobile sand dune near the town of Lieberose in Brandenburg, Germany. In the glacier forefield, a soil chronosequence was established, and samples from 10, 50, 70, 120, and more than 2000 years of soil development were analysed. The climate at the glacier is alpine. The glacier forefield receives 2400 mm rain annually and the mean temperature is between 0 and 5 °C. In contrast, the climate at the Lieberose sand dune is continental with 570 mm rain annually and a mean temperature of 8.9 °C. On the sand dune, three phases of biological soil crust (BSC) were sampled, ranging from thin BSC, dominated by cyanobacteria, to dark BSC, dominated by algae and mosses. For comparison, mobile sand without BSC and the rooting zone of *Corynephorus canescens* were sampled. At both sites, different phases of ecosystem development were investigated and characterised for abundance of microorganisms involved in the N cycle and the activity of the individual process.

In addition, the rhizosphere effect of *Leucanthemopsis alpina* on the microbial N cycling was investigated in two contrasting soils of the soil chronosequence. The objective was to assess the rhizosphere effect in initial (10 years ice-free) versus developed soil (120 years ice-free). Lastly, a novel data analysis method for the quantification of microorganisms by real-time quantitative PCR (qPCR) was developed and tested.

Four major processes dominating the terrestrial N cycle in soil were investigated for gene abundance and enzyme activity. Gene abundance was determined by qPCR, targeting the marker genes (enzyme and gene in brackets) of each of the four processes: N fixation (nitrogenase – *nifH*), mineralisation (protease – *aprA*, chitinase – *chiA*), nitrification (ammonium monooxygenase – *amoA*) and denitrification (nitrite reductases – *nirK* and *nirS*, nitrous oxide reductase – *nosZ*). Enzyme activities were measured by potential enzyme.

At the soil chronosequence of the glacier forefield, the soil development was associated with an increase in the soil nutrients, the abundance of marker genes, and the potential enzyme activities. Potential N fixation activity was only detected in developed soil and ranged between 1 and 3 pmol N g⁻¹ h⁻¹. Similarly, potential nitrification and denitrification activity were low in the initial soil but increased in the developed soil. The potential nitrification rate increased from 0.1 to 2.3 nmol NO₂⁻-N g⁻¹ h⁻¹, while the potential denitrification rate increased from 1.8 to 40 nmol N₂O-N g⁻¹ h⁻¹. In contrast, chitinase and protease activity were high in the initial soil (14 and 5 nmol MUF g⁻¹ h⁻¹) and showed a comparatively minor increase to 72 and 25 nmol MUF g⁻¹ h⁻¹, respectively. Gene abundance of protease (*aprA*), chitinase (*chiA*), ammonium monooxygenase (*amoA*) of archaea, and nitrous oxide reductase (*nosZ*) were correlated with the corresponding potential enzyme activities. However, nitrogenase (*nifH*) gene abundance was highest in the 50 year old soil (2 × 10² copies g⁻¹) and did not match the potential enzyme activity.

The rhizosphere effect of *Leucanthemopsis alpina* was associated with an increased abundance of the *nifH* gene in the initial soil (1.7 × 10⁷ copies g⁻¹) compared to the developed soil (10⁷ copies g⁻¹). Conversely, the *nosZ* gene was most abundant in the rhizosphere of the developed soil (5.1 × 10⁷ copies g⁻¹). This indicates that the plants in the initial soils containing low amounts of N stimulated the process of N fixation. The presence of plants in the developed soil with high amounts of available nitrate, however, stimulated the denitrification process.

At the Lieberose sand dune, the BSC development was characterised by an increase in nutrient and chlorophyll content. Similarly, potential enzyme activities and gene abundance increased. In the developed BSCs, nitrification (3.5 nmol NO₂⁻-N g⁻¹ h⁻¹) appeared to be the dominant process but denitrification (1.2 nmol N₂O-N g⁻¹ h⁻¹) and mineralisation (1.5 nmol MUF g⁻¹ h⁻¹) were also involved in N cycling. Compared to the other processes N fixation was very low in all BSCs (<30 pmol C₂H₄ g⁻¹ h⁻¹).

The last part of the study was dedicated to the improving of real-time quantitative PCR (qPCR) data analysis. Currently, the standard curve (SC) method

is commonly used in environmental microbiology. As an alternative absolute quantification method, the One-Point-Calibration (OPC) method was developed and tested. The experiments demonstrated the importance of accounting for amplification efficiency in analysing samples of unknown composition. Quantification by the OPC method were accurate while the SC method over- or underestimated the copy numbers up to 5-fold.

In summary, the N cycle development in the glacier forefield and the sand dune followed similar patterns. As a general rule, at pioneer sites three stages of N cycle development can be distinguished: the heterotrophic stage, the transition stage, and the developed stage. During the heterotrophic stage, a community of opportunistic microorganisms feeds on allochthonous and recalcitrant organic matter, and the process of mineralisation dominates the N cycle. In the transition stage, primary producers such as BSC or plants colonise the system and stabilise the soil surface; N starts to accumulate. During the developed stage, nitrification and denitrification gain importance and a closed N cycle, within which all processes are active, is established.

Zusammenfassung

Pionierstandorte – wie die Vorfelder schmelzender Gletscher, mobile Sanddünen oder vulkanische Lavaströme – stellen ideale Umgebungen dar, um die Entwicklung von terrestrischen Ökosystemen zu untersuchen. Sie zeichnen sich durch karge Vegetation und geringen Nährstoffgehalt aus. Stickstoff (N) ist dort anfangs kaum vorhanden, da dieser kein Mineralbestandteil des Muttergesteins ist. Dennoch reichert sich N innerhalb weniger Jahre im Boden an, und Pflanzen besiedeln den Lebensraum, was auf eine schnelle Entwicklung des Stickstoffkreislaufes hindeutet. Innerhalb des N Kreislaufes werden viele Prozesse nur durch Archaea, Bacteria und Fungi vollzogen. Daher regulieren Mikroorganismen den Stickstoffkreislauf im Boden.

Ziel dieser Arbeit war es, die Entwicklung des Stickstoffkreislaufes in Pionierstandorten zu untersuchen. Dazu wurden zwei gegensätzliche Pionierstandorte betrachtet. Zum einen, das Vorfeld des abschmelzenden Damma Gletschers im Kanton Uri, Schweiz. Zum anderen, eine mobile Sanddüne nahe der Ortschaft Lieberose in Brandenburg, Deutschland. Im Gletschervorfeld besteht eine Bodenchronosequenz von der Bodenproben entnommen und untersucht wurden, die seit 10, 50, 70, 120 und mehr als 2000 Jahren eisfrei sind. Das Standortklima ist alpin. Der Jahrestemperaturdurchschnitt beträgt 0 bis 5 °C und der Jahresniederschlag 2400 mm. Im Gegensatz dazu ist das Klima an der Lieberose Düne kontinental. Der Jahresniederschlag beträgt 570 mm und die Jahresdurchschnittstemperatur 8.9 °C. Auf der Düne können verschiedene Stadien von biologischen Bodenkrusten (BSC) beobachtet werden, von initialen Krusten (dominiert von Cyanobakterien) bis hin zu dunklen Krusten (dominiert von Algen und Moosen). Drei Stadien dieser Krusten, mobiler Dünensand und der Wurzelraum von benachbartem Silbergras (*Corynephorus canescens*) wurden untersucht. An beiden Standorten wurde die Entwicklung des Stickstoffkreislaufes durch zwei verschiedene Parameter charakterisiert. Erstens, die Abundanz der am Stickstoffkreislauf involvierten Mikroorganismen. Zweitens, die Aktivität der Stickstoffumwandlungsprozesse.

Eine weitere Fragestellung war der Einfluss der Alpenmargerite (*Leucanthe-mopsis alpina*) auf die Abundanz der stickstoffumsetzenden Mikroorganismen. Hierbei wurden Unterschiede im Rhizospäreneffekt zwischen initialem Boden

(10 Jahre eisfrei) und entwickeltem Boden (120 Jahre eisfrei) betrachtet. Weiterhin wurde eine neue Datenanalysemethode für die Auswertung von qPCR entwickelt und getestet.

Der terrestrische Stickstoffkreislauf wird durch vier Prozesse dominiert, die mittels Genabundanz und Enzymassays charakterisiert wurden (Enzyme und Gene in Klammern): Stickstofffixierung (Nitrogenase – *nifH*), Mineralisation (Protease – *aprA*, Chitinase – *chiA*), Nitrifikation (Ammonium-monooxygenase – *amoA*), Denitrifikation (Nitritreduktasen – *nirK* und *nirS*, Distickstoffmonoxid-Reduktase – *nosZ*). Die Genabundanzen funktionaler Markergene wurden mit der qPCR Methode quantifiziert. Die zugehörigen potentielle Enzymaktivitäten wurden mit etablierten Methoden gemessen.

Entlang der Chronosequenz stiegen Nährstoffgehalte, Genabundanzen und potentielle Enzymaktivitäten zusammen mit dem Bodenalter an. Die potentielle Stickstofffixierung lag nur in entwickeltem Boden (120 und >2000 Jahre) über der Nachweisgrenze und betrug zwischen 1 und 3 pmol N g⁻¹ h⁻¹. Ganz ähnlich waren potentielle Nitrifikation und Denitrifikation von geringer Aktivität in den initialen Böden, die mit zunehmender Bodenentwicklung aber stark anstieg. Die potentielle Nitrifikation stieg von 0.1 auf 2.3 nmol NO₂⁻-N g⁻¹ h⁻¹ und die potentielle Denitrifikation stieg von 1.8 auf 40 nmol N₂O-N g⁻¹ h⁻¹. Im Gegensatz dazu waren potentielle Chitinase- und Proteaseaktivität in den initialen Böden relativ hoch (14 bzw. 5 nmol MUF g⁻¹ h⁻¹) und zeigten nur einen geringen Anstieg auf 72 bzw. 25 nmol MUF g⁻¹ h⁻¹. Genabundanzen von Protease (*aprA*), Chitinase (*chiA*), archaeele Ammonium-monooxygenase (*amoA*) und Distickstoffmonoxid-Reduktase (*nosZ*) korrelierten mit den entsprechenden potentiellen Enzymaktivitäten. Die Abundanz des Nitrogenase Gens (*nifH*) jedoch war am höchsten in demjenigen Boden, der 50 Jahre eisfrei war (2×10² Kopien g⁻¹) und korrelierte nicht mit der gemessenen potentiellen Stickstofffixierungsrate.

Der Effekt der Rhizosphäre von *Leucanthemopsis alpina* auf die Abundanz des *nifH* Gens war im initialen Boden (10 Jahre eisfrei) am größten. Dort wurden 1.7×10⁷ Kopien g⁻¹ gemessen, wohingegen im entwickelten Boden (120 Jahre eisfrei) nur 10⁷ Kopien g⁻¹ gemessen wurden. Im Gegensatz zum *nosZ* Gen, das am häufigsten in der Rhizosphäre im entwickelten Boden anzutreffen war (5.1×10⁷ Kopien g⁻¹). Dies deutet darauf hin, dass Pflanzen die im wenig Nährstoffe enthaltenden initialen Boden wachsen die Stickstofffixierung anregen. Im entwickelten Boden hingegen, der relativ höhere Gehalte an Nitrat aufweist, wurde durch die Pflanzen die Denitrifikation stimuliert.

Die fortschreitende Entwicklung der biologischen Krusten auf der Lieberose Düne ist durch eine Zunahme der Nährstoffgehalte des Chlorophyllgehaltes gekennzeichnet. Genauso nehmen Genabundanz und potenzielle Enzymaktivitäten zu. In den entwickelten BSC erschien der Prozess der Nitrifikation dominant ($3.5 \text{ nmol NO}_2^- \text{-N g}^{-1} \text{ h}^{-1}$), jedoch waren auch Denitrifikation ($1.2 \text{ nmol N}_2\text{O-N g}^{-1} \text{ h}^{-1}$) und Mineralisation ($1.2 \text{ nmol N}_2\text{O-N g}^{-1} \text{ h}^{-1}$) am Stickstoffkreislauf beteiligt. Potentielle Stickstofffixierung war in allen Entwicklungsstadien vergleichsweise gering ($<30 \text{ pmol C}_2\text{H}_4 \text{ g}^{-1} \text{ h}^{-1}$).

Im letzten Teil dieser Arbeit wurde an einer neuen Methode der Datenanalyse für real-time quantitative PCR (qPCR) gearbeitet. Zur Zeit wird in der Umweltmikrobiologie für die qPCR Datenanalyse die Standardkurven-Methode (SC) benutzt. Als alternative Methode zur absoluten Quantifizierung wurde die Ein-Punkt-Kalibrations-Methode (OPC) entwickelt und getestet. Die Experimente machten deutlich, wie wichtig die Beachtung der qPCR-Effizienz ist, wenn Proben unbekannter Zusammensetzung amplifiziert werden.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass sich der Stickstoffkreislauf sowohl im Gletschervorfeld, als auch in der Sanddüne nach einem ähnlichen Muster entwickelte. Danach können an Pionierstandorten drei Phasen unterschieden werden: die heterotrophe Phase, die Übergangsphase und die entwickelte Phase. Während der heterotrophen Phase besteht eine Gemeinschaft aus opportunistischen Mikroorganismen, die sich von allochthonem und rekalzitrantem organischen Material ernähren. Die Phase wird vom Prozess der Mineralisation dominiert. In der Übergangsphase etablieren sich Primärproduzenten wie BSC oder Pflanzen, die die Bodenoberfläche stabilisieren; somit kann sich Stickstoff im Boden akkumulieren. In der entwickelten Phase gewinnen dann Nitrifikation und Denitrifikation an Einfluss was zur Folge hat, dass sich der Stickstoffkreislauf schließt.