

DISS. ETH N°. 19128

Visualization of microbes involved in soil methane dynamics

A dissertation submitted to

ETH ZURICH

for the degree of

Doctor of Sciences

presented by

Petra Alexandra Braun

Dipl. Umwelt-Ing., ETH Zurich

Date of birth: 25.03.1980

Citizen of Zollikon (ZH), Switzerland

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Nina Buchmann, examiner
PD Dr. Pascal A. Niklaus, co-examiner
Prof. Dr. David S. Powlson, co-examiner

2010

Abstract

Aerobic soils can contain microbes capable of assimilating methane (CH_4). Under anaerobic conditions, other soil microbes might produce CH_4 . If soil CH_4 uptake exceeds CH_4 emissions, the soil is defined as a CH_4 sink. Worldwide, soils acting as CH_4 sinks are accounted to assimilate up to 10% of natural and anthropogenic CH_4 emissions from the atmosphere. The terrestrial CH_4 sink is important to be maintained in terms of climate regulation because CH_4 is one of the most important greenhouse gases. Uptake of atmospheric CH_4 depends on soil moisture and soil texture. Nitrogen fertilization and soil acidification might significantly reduce CH_4 assimilation by the microbes involved (methanotrophic bacteria). However, the mechanisms regulating CH_4 uptake are only partially understood. Interactions between soil methanotrophs and their environment are complex as soil physical parameters and chemical components vary. Consequently, estimations of the terrestrial CH_4 sink under future conditions and recommendations for managing soils in order to maintain the soil CH_4 sink are complicated.

In this work, we studied assimilation of atmospheric CH_4 in the soil. The aim was to study spatial distributions of CH_4 assimilation in different ecosystems and how these distributions change under treatments such as drought, liming and nitrogen fertilization. By additionally measuring net CH_4 flux rates, the CH_4 uptake regulating mechanisms underlying ecosystem level effects of treatments were studied.

The development of a new approach allowed for the first time to study the spatial distribution of CH_4 assimilation in the intact soil structure. In brief, microbes in undisturbed soil cores were labelled with $^{14}\text{CH}_4$. Samples were subsequently freeze-dried and embedded in epoxy resin. Casted samples were sawn in vertical oriented soil sections. Finally, autoradiographic images were generated having a resolution of 50 μm . This method was applied to several forest soils (*Alptal* and *Lägern*) and grassland soils (*Furka*, *Alp Weissenstein* and *Früebüel*) in Switzerland to investigate the impacts of soil structure, pH and bedrock on CH_4 uptake. Moreover, the effect of NH_4^+ based fertilizers was investigated by comparing results from fertilized and unfertilized plots in three experiments: 1. Ammonium nitrate (NH_4NO_3) was added to

locally collected rain water which then was sprinkled over the ground vegetation of a forest soil at *Alptal* during more than ten years. 2. Urine from cattle and NH_4NO_3 were applied during two years to two grasslands (*Alp Weissenstein* and *Früebüel*), while in half of the plots summer drought was simulated by the installation of rain shelters. The effect of the amount of these fertilizers has been tested with a gradient experiment at *Früebüel*. 3. Ammonium sulphate ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), sodium nitrate (NaNO_3) and manure were applied for more than hundred years to grassland plots (Park Grass experiment at *Rothamsted*, UK) which contain a pH gradient (pH 4.0-7.0) as a consequence of liming. This pH gradient was also achieved in unfertilized soil at the Park Grass experiment. Net CH_4 flux rates have been measured in the laboratory and additionally *in situ* at *Alptal*, *Furka* and at the Park Grass experiment.

The spatial distribution of CH_4 uptake in unfertilized soils depended mainly on soil aggregation and soil moisture. Drought significantly increased CH_4 uptake at *Früebüel* and *Alp Weissenstein* and the CH_4 assimilation at the bottom of the soil cores was increased in the dry compared to the moist samples from *Früebüel*. Grassland soils showed a distinct maximum in CH_4 uptake at 2.5–5.0 cm depth, while maximum CH_4 assimilation in forest soils occurred in 4.0-10.0 cm depth. Increased amounts of CH_4 assimilated at the edges of aggregates (especially in forest soils), along pores, in some porous stones and around limestone rocks. Roots did not directly affect CH_4 uptake. Hardly any CH_4 assimilated in humus layers. Results from the fertilizer experiments demonstrated that ammonium rather than nitrate reduced CH_4 uptake. However, effects only occurred when soils were either acidified or dry, probably due to low nitrification rates and little NH_4^+ uptake by plants under these conditions, respectively. Liming was found to prevent negative effects of NH_4^+ based fertilizers on CH_4 uptake in moist soils. Inhibition of CH_4 uptake by fertilizers was frequently restricted to only a part of the soil which might explain controversial findings of previous studies which did not consider the spatial dimension of fertilizer effects. Under dry conditions at *Alp Weissenstein* and *Früebüel*, nitrogen fertilizers inhibited CH_4 uptake in the subsoil, while below, simultaneously CH_4 uptake increased. *In situ* measured CH_4 flux results from a partner project suggest that this shift of the CH_4 assimilating soil layer did not affect the CH_4 sink of the entire soil.

Our results suggest that summer droughts which are predicted to occur more frequently in Switzerland in the next decades will rather increase than decrease CH₄ uptake in Swiss grassland soils. However, nitrogen fertilizers should not be applied to very dry soils in consecutive years, as continuous treatments might increase the fraction of the soil in which CH₄ uptake is inhibited, thus reducing net CH₄ uptake of the soil. High amounts of ammonium releasing fertilizers should rather be applied in organic forms than in inorganic forms to minimize interference with the soil CH₄ sink.

Zusammenfassung

Aerobe Böden können Mikroorganismen enthalten, welche atmosphärisches Methan (CH_4) assimilieren. Unter anaeroben Bedingungen können andere Bodenmikroben CH_4 produzieren. Je nachdem ob die CH_4 Aufnahme oder die CH_4 Emissionen eines Bodens überwiegen, ist der Boden als CH_4 Senke oder als CH_4 Quelle definiert. Böden, die als CH_4 Senken wirken, nehmen bis zu 10% des weltweit durch natürliche und anthropogene Prozesse emittierten CH_4 aus der Atmosphäre auf. Die Erhaltung der Bodensenke für CH_4 ist bedeutend für die Klimaregulierung, weil CH_4 eines der wichtigsten Treibhausgase ist. Wassergehalt und Bodenstruktur regulieren die terrestrische CH_4 Aufnahme aus der Atmosphäre. Stickstoffdüngung und Bodenversauerung können die CH_4 Assimilation durch Mikroorganismen (methanotrophe Bakterien) erheblich senken. Die regulierenden Mechanismen der atmosphärischen CH_4 Aufnahme in Böden sind jedoch nur teilweise bekannt. Die Interaktionen zwischen methanotrophen Bakterien und ihrer Umwelt sind komplex, da insbesondere physikalische Parameter und chemische Stoffe im Boden variieren. Aufgrund dessen ist es besonders schwierig abzuschätzen, wie terrestrische CH_4 Senken auf ändernde Umweltbedingungen reagieren und Empfehlungen für eine nachhaltige Bodenbewirtschaftung in Bezug auf die CH_4 Senke zu gestalten.

In dieser Arbeit wurde die Aufnahme von atmosphärischem CH_4 in Böden untersucht. Das Ziel dieser Dissertation bestand darin, die räumliche Verteilung der atmosphärischen CH_4 Assimilation in Böden verschiedener Ökosysteme zu erforschen und zu untersuchen, wie sich diese Verteilungen unter Trockenheit, Boden-Kalkung und Stickstoffdüngung ändern. Die hier beschriebenen Experimente wurden durchgeführt, um das Verständnis der Regulierung der CH_4 Senkenfunktion von Böden zu verbessern. Deswegen wurden zusätzlich CH_4 netto Flussraten der Böden gemessen.

Mit der Entwicklung eines neuen Ansatzes gelang es erstmals, die Verteilung der CH_4 Aufnahme im intakten Bodengefüge zu erfassen und darzustellen. Dabei wurden die methanotrophen Bakterien in ungestörten Bodenproben mit $^{14}\text{CH}_4$ markiert. Anschliessend wurden die Proben gefriergetrocknet in Epoxydharz eingebettet und in

vertikale Scheiben gesägt. Von diesen wurden schlussendlich Autoradiographien mit einer Auflösung von 50 μm hergestellt. Mit diesem Ansatz wurde die räumliche Verteilung der CH_4 Aufnahme in Proben verschiedener Schweizer Wald- (*Alptal* und *Lägern*) und Graslandböden (*Furka*, *Alp Weissentein* und *Früebüel*) mit Berücksichtigung der Bodenstruktur, des pH und des Gesteins untersucht. Ausserdem wurde der Einfluss von Stickstoffdüngern auf die CH_4 Aufnahme in drei Experimenten untersucht: 1. In einem Wald in *Alptal* wurde während mehr als zehn Jahren dem lokal gesammelten Regenwasser Ammoniumnitrat (NH_4NO_3) beigelegt und dieses mit Sprinklern ausgebracht. 2. Auf zwei Wiesen (*Früebüel* und *Alp Weissenstein*) wurden während zwei Jahren Urin von Kühen, sowie NH_4NO_3 ausgebracht. Zusätzlich wurde auf der Hälfte der Plots Trockenheit durch Regendächer simuliert. Darüber hinaus wurde auf *Früebüel* die Wirkung der Düngermengen in einem Gradientenexperiment untersucht. 3. Im Park Grass experiment in *Rothamsted*, England wurden während mehr als 100 Jahren die Dünger Ammoniumsulfat ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), Natriumnitrat (NaNO_3) und Mist ausgebracht. Die Düngerefelder und der Kontrollstreifen enthalten zudem einen durch Kalkung eingestellten pH Gradienten (pH 4,0-7,0). Von allen Proben wurden die netto CH_4 Flussraten im Labor gemessen und auf den Standorten *Alptal*, *Furka*, und im Park Grass Experiment zudem *in situ* bestimmt.

Die Resultate zeigten, dass in ungedüngten Böden überwiegend Bodenstruktur und Wassergehalt die räumliche Verteilung der CH_4 Aufnahme beeinflussten. Trockenheit erhöhte die CH_4 Aufnahme auf *Früebüel* und *Alp Weissenstein* und führte in Proben von *Früebüel* zu einer Tiefenerweiterung der CH_4 aufnehmenden Bodenschicht. Wiesenböden nahmen am meisten CH_4 in 2,5-5,0 cm, Waldböden in 4,0-10,0 cm Tiefe auf. Erhöhte Mengen an CH_4 wurden an Aggregatrandern (insbesondere in Waldböden), entlang Bodenporen, in porösen Steinen sowie um Kalksteine assimiliert. Wurzeln hatten keinen direkten Einfluss auf die CH_4 Aufnahme. In Humusschichten wurde kaum CH_4 assimiliert. Aus den Düngereperimenten ging hervor, dass Ammonium die CH_4 Aufnahme stärker inhibiert als Nitrat. Die inhibierenden Effekte der Dünger traten jedoch nur im Zusammenhang mit Bodenversauerung oder bei Trockenheit auf, wahrscheinlich weil die Nitrifikationsraten mit sinkendem pH abnehmen und Pflanzen bei Trockenheit weniger NH_4^+ aufnehmen. Das Kalken verhinderte die Reduktion der CH_4

Assimilation durch Ammonium in feuchten Böden. Die Inhibierung der CH₄ Aufnahme betraf häufig nur einen Teil des Bodens, was möglicherweise kontroverse Resultate bisheriger Effektstudien erklärt, die die räumliche Dimension der Effekte nicht berücksichtigt hatten. Unter Trockenheit inhibierte die Stickstoffdüngung auf *Alp Weissenstein* und *Früebüel* die CH₄ Aufnahme im Oberboden, worauf sich die CH₄ Aufnahme in der darunterliegenden Bodenschicht erhöhte. Diese Verschiebung der CH₄ assimilierenden Schicht im Boden hatte gemäss *in situ* Messungen, die in einem Partnerprojekt durchgeführt wurden, keine Konsequenzen für die CH₄ Senke des Bodens.

Aufgrund der vorliegenden Resultate dieser Studie erwarten wir, dass unter dem Einfluss von Sommerdürren, die bei fortschreitendem Klimawandel in der Schweiz wahrscheinlich häufiger auftreten werden, die CH₄ Aufnahme von Schweizer Wiesenböden eher erhöht wird. Allerdings sollte es vermieden werden Stickstoffdünger wiederholt auf sehr trockene Böden auszubringen, da dadurch möglicherweise eine Inhibierung der Methanaufnahme in weiteren Teilen des Bodens auftritt. Grosse Mengen an Düngern, die Ammonium freisetzen, sollten eher in organischer als in anorganischer Form ausgebracht werden, um die CH₄ Aufnahme nicht zu beeinflussen.