

Diss. ETH No° 18327

**Diazotrophic microorganisms in the root zone of alpine pioneer plants:
populations, functions and interactions**

A dissertation submitted to the
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZURICH

for the degree of
Doctor of Sciences

presented by

LAURENCE DUC

Dipl. Biologist, University of Lausanne

born on April 20, 1978

citizen of Forel (FR)

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Josef Zeyer, examiner

Prof. Dr. Hans-Martin Fischer, co-examiner

Dr. Ralph Schlapbach, co-examiner

Dr. Stefan Neuenschwander

2009

SUMMARY

Forefields created by receding glaciers represent unique and sensitive environments as well as natural chronosequences in which biological succession and soil development can be studied. Similarly to plants and animals, microbial communities are subject to successional development. The microbial succession has important effects on soil development and plant establishment as microbes play key roles in nutrient cycling. In young glacier forefield soils, nitrogen is a limiting nutrient, especially in the rhizosphere of pioneer plants where additional carbon is made available through root exudation. Under nitrogen-limited conditions the ability to fix nitrogen might represent a selective advantage for nitrogen-fixing microorganisms (diazotrophs). Symbiotic nitrogen fixation participates significantly to nitrogen accumulation in alpine soils. However, symbiotic plant species are rarely found in early stages of the chronosequence. Therefore, free-living diazotrophs can be expected to be competitive in young glacier forefields and to stimulate the growth of pioneer plants interacting with them. The aim of this thesis was to obtain new insights on the role and ecology of microbial and particularly of free-living diazotrophic communities in the dynamic and highly heterogeneous glacier forefield environment. Special emphasis was given to the impact of pioneer plant presence on these communities.

In the first part of this thesis, the spatial extent of plant-microorganism interactions in the young Damma glacier forefield was assessed by determining microbial cell counts, enzyme activities, as well as the eubacterial community structure at different distances from the plant. Results indicated that microbial cell number and enzymatic activity per cell were increasing in presence of the plant, despite an unaffected microbial community structure. This effect extended beyond the root zone, at least 20 cm around pioneer plants.

The second part of the study focuses on free-living diazotrophic communities in Damma glacier forefield soils. Asymbiotic nitrogen fixation was assessed using the acetylene reduction assay. This activity was positively influenced by the presence of the plant. Free-living diazotrophic diversity and population structure were determined by the assemblage of *NifH* sequence libraries. The phylogenetical analysis revealed 45 unique *NifH* phylotypes broadly distributed among the *nifH* phylogeny. The *NifH* diversity was higher than those formerly observed in other environments, confirming the hypothesis of free-living diazotrophs being relevant and potentially contributing to nitrogen input in this nitrogen-limited environment. In contrast to observations on eubacterial communities, free-living diazotrophic diversity decreased significantly in presence of the plant. *NifH* sequences related to methanotrophic microorganisms and *Cyanobacteria* were particularly frequent.

Based on the phylogenetical analysis mentioned above, a *nifH* oligonucleotide microarray was developed for the monitoring of free-living diazotrophs in glacier forefield soils. A total of 946 probes (20 nts) designed *in silico* were validated experimentally using the Geniom® One in situ synthesis platform. This probe set covered 35 *NifH* phylotypes out of the 45 found in glacier forefield soils and delivered consistent and accurate data. This experimental approach proved to be highly suitable and recommended for probe selection.

This new tool was then applied to investigate the effect of variable environmental parameters on of free-living diazotrophic populations. Plant presence revealed to have a stronger impact at the beginning of the vegetation period compared to that observed in September and to buffer the impact of the season. Both nitrogen deposition and temperature increase had higher impacts in rhizosphere soils compared to bulk soils, probably due to their positive influence on plant growth. This observation indicates strong carbon limitation in glacier forefield soils. Finally, *Methylocystis* related bacteria were mostly responding to environmental variations. These methanotrophic microorganisms able to use atmospheric methane as sole carbon source seem to be particularly adapted to extreme nutritional and climatic conditions found in glacier forefields. Therefore, they might play a key role in maintaining nitrogen fixation in these harsh environments.

RÉSUMÉ

Les moraines frontales créées par le retrait des glaciers constituent des environnements uniques et fragiles, ainsi que des chronoséquences naturelles permettant l'étude des successions biologiques et du développement du sol. Similairement à la flore et la faune, les communautés microbiennes sont sujettes au développement successional. Les successions microbiennes sont supposées avoir un effet important sur le développement du sol et l'établissement de la végétation, dû principalement au rôle clé joué par les micro-organismes dans les cycles nutritifs du sol. La quantité d'azote présent dans les jeunes moraines est limitée, spécialement dans la rhizosphère des plantes pionnières, où les exsudats racinaires représentent une source de carbone additionnelle. Dans de telles conditions de carence azotée, l'aptitude à fixer le diazote atmosphérique peut représenter un avantage sélectif pour les bactéries fixatrices d'azote. La fixation symbiotique de l'azote participe significativement à l'accumulation de l'azote dans les sols alpins. Pourtant, les espèces de plantes symbiotiques sont rares dans les jeunes stades de la chronoséquence. Dès lors, on peut s'attendre à ce que les bactéries libres fixatrices d'azote soient particulièrement compétitives dans cet environnement et qu'elles stimulent la croissance des plantes pionnières interagissant avec elles. L'objectif de cette thèse était d'obtenir un nouvel aperçu sur le rôle et l'écologie des communautés microbiennes, en particulier des communautés fixatrices d'azote dans l'environnement dynamique et hétérogène formé par les jeunes moraines frontales. Une attention spéciale a été portée sur l'influence des plantes pionnières sur ces communautés.

Dans un premier temps, l'étendue spatiale des interactions plante-bactéries dans la moraine frontale du glacier Damma a été déterminée par l'évaluation du nombre de cellules microbiennes, des activités enzymatiques et de la structure de la communauté eubactérienne à différentes distances de la plante. Les résultats ont indiqué un nombre de cellules microbiennes et une activité enzymatique par cellule croissantes en présence de la plante, malgré une communauté microbienne stable. Cet effet a été identifié au-delà de la zone racinaire, à un minimum de 20 cm de distance des plantes pionnières.

La seconde partie de cette étude se focalise sur les communautés de bactéries libres fixatrices d'azote de cette même moraine frontale. La fixation biologique de l'azote a été mesurée grâce à la méthode de réduction de l'acétylène. Cette activité s'est révélée être positivement influencée par la présence de la plante. La diversité des bactéries libres fixatrices d'azote et la structure de leur population a été évaluée par l'assemblage de bibliothèques de clones *nifH*. L'analyse phylogénétique a dévoilé 45 phylotypes uniques, largement distribués au sein de la phylogénie *nifH*. La diversité NifH s'est révélée être plus grande que celles trouvées dans d'autres environnements, confirmant ainsi l'importance de bactéries libres fixatrices d'azote et de leur potentielle contribution à l'enrichissement en azote des moraines frontales. En contraste aux observations sur les communautés eubactériennes, une diversité des bactéries libres fixatrices d'azote plus petite a été décelée en présence de plantes. Finalement, un grand nombre de séquences NifH ont pu être associées aux bactéries méthanotrophes et aux *Cyanobacteria*.

En se basant sur l'analyse phylogénétique mentionnée ci-dessus, un microarray *nifH* a été conçu pour l'étude des bactéries libres fixatrices d'azote dans les moraines frontales. Un total de 946 sondes (20 nucléotides), créées *in silico*, ont été validées expérimentalement en utilisant la plateforme de synthèse in situ Geniom® One. Cet assortiment de sondes couvrant 35 phylotypes NifH sur les 45 trouvés dans la moraine frontale du glacier Damma a délivré des résultats cohérents et précis. Cette approche expérimentale a prouvé être appropriée et de ce fait, est recommandée pour la sélection de sondes. Ce nouvel outil a été appliqué afin d'évaluer l'effet de paramètres environnementaux variables sur les populations libres fixatrices d'azote. La présence de plantes a révélé avoir un impacte plus grand au début de la période de végétation comparé au mois de septembre. Nos résultats ont également montré que la présence de plantes atténue l'impacte de la saison. La déposition d'azote et l'augmentation de la température ont induit des effets plus grands dans le sol rhizosphérique que dans le sol simple, probablement dû à leur influence positive sur la croissance de la plante. Cette observation indique une forte carence en carbone dans les jeunes sols périglaciaires. Finalement, les bactéries apparentées au genre *Methylocystis* ont montré une forte réponse aux variations environnementales. Ces bactéries méthanotrophiques capable d'utiliser le méthane atmosphérique comme seule source de carbone semblent être particulièrement adaptées aux conditions nutritives et climatiques extrêmes observées dans les moraines frontales. On peut de ce fait supposer qu'elles jouent un rôle important dans le maintien de la fixation biologique de l'azote dans ces environnements particulièrement rudes.