

Tagungsbeitrag zu: Jahrestagung der
DBG, Kommission IV
Titel der Tagung: Böden verstehen,
Böden nutzen, Böden fit machen
Veranstalter: DBG, 03.-09.09.2011,
Berlin und Potsdam
Berichte der DBG (nicht begutachtete
Online-Publikation)
<http://www.dbges.de>

Anteil von Pilzen und Bakterien an der Lachgasbildung in verschiedenen Böden

Lena Rohe¹, Reinhard Well¹, Nicole
Wrage², Traute-Heidi Anderson¹, Heinz
Flessa¹

Schlüsselworte

Denitrifikation, N₂O-Bildung,
Isotopensignatur

Einleitung

Das klimarelevante Spurengas N₂O wird in landwirtschaftlich genutzten Böden vor allem durch mikrobiologische Prozesse gebildet, insbesondere durch die Nitrifikation und Denitrifikation (Smith et al. 2008, Baggs et al. 2008). Diese N₂O-Bildung wurde jahrzehntelang den Bakterien zugeschrieben. Nicht ausreichend erforscht ist jedoch, welchen Anteil die Pilze im Gegensatz zu den Bakterien an der N₂O-Bildung haben. Die Bildung von N₂O durch pilzliche Denitrifikation

¹Institut für Agrarrelevante
Klimaforschung

Johann Heinrich von Thünen-Institut
Bundesallee 50, 38116 Braunschweig
lena.rohe@vti.bund.de

²Fakultät Life Sciences

Hochschule Rhein-Waal
Landwehr 4, 47533 Kleve

wird möglicherweise weit unterschätzt: Durch Reinkulturversuche mit Pilzen konnte gezeigt werden, dass bei pilzlicher Denitrifikation meist keine N₂O-Reduktion stattfindet und somit N₂O das Endprodukt dieses Reaktionsweges ist (Shoun et al. 1992). Dadurch könnte der relative N₂O-Anteil bei gleicher Umsetzung durch die Mikroorganismen bei der pilzlichen Denitrifikation höher sein als bei der bakteriellen (Sutka et al. 2008). Eine Unterscheidung zwischen der pilzlichen und bakteriellen N₂O-Bildung im Boden ist demnach eine Grundvoraussetzung, um die Zusammenhänge der N₂O-Quell- und Senkenprozesse zu verstehen und um effektive Minderungsmaßnahmen für N₂O-Emissionen zu entwickeln.

Die Anwendung selektiver Inhibitoren und Untersuchung der N₂O-Isotopomersignatur könnten geeignet sein, eine Unterscheidung der pilzlichen und bakteriellen N₂O-Bildung zu ermöglichen. Untersuchungen mit Reinkulturen haben gezeigt, dass N₂O von bakteriellen und pilzlichen Denitrifikanten eine unterschiedliche positions-spezifische ¹⁵N-Signatur (¹⁵N-Positionspräferenz = Differenz zwischen den $\delta^{15}\text{N}$ -Werten der terminalen und zentralen N-Atome im linearen N₂O-Molekül, in per mil) (Well et al. 2006) aufweist. Die ¹⁵N-Positionspräferenz von Versuchen mit Reinkulturen lag bei 36 bis 37 ‰ bei pilzlicher Denitrifikation und bei bakterieller Denitrifikation zwischen -10,7 bis 0 ‰ (z.B. Sutka et al. 2006, Sutka et al. 2008, Frame & Casciotti 2010).

Ziel der Studie ist es, (a) den pilzlichen Beitrag zur N₂O-Bildung in verschiedenen Böden bei variiertem

Feuchte zu bestimmen und (b) zu prüfen, inwieweit der Beitrag von Bakterien und Pilzen zu den N₂O-Emissionen mittels Isotopensignaturen abschätzbar ist.

Material und Methoden

Die Versuche erfolgten unter Berücksichtigung von jeweils zwei Landnutzungen (Abb. 1). Es wurde Boden aus den oberen 30 cm verwendet. Mittels der Substrat-induzierten Respiration mit selektiver Hemmung (Anderson & Domsch, 1975) wurde in Vorversuchen die potentielle respiratorische Aktivität der Pilze und Bakterien in den Böden ermittelt, um einen Anhaltspunkt über den Anteil der Pilze und Bakterien an der mikrobiellen Biomasse zu bekommen. Die Bestimmung des respiratorischen Pilz:Bakterien-Verhältnisses wurde in einem Durchflusssystem mit automatischem Infrarot-Gasanalysator (stündlich) ermittelt (Heinemeyer et al. 1989). Dabei kann nach Substratzugabe (Glukose) CO₂ als Produkt der Respiration gemessen werden. Die folgenden vier Varianten mit jeweils 25 g trockenem Boden (Trockenmasse = T_M) ($n = 3$) und Glukose als Substrat wurden mit der Zugabe von

- a) keinem Wachstumshemmer, Kontrolle,
- b) Streptomycin (Wachstumshemmung der Bakterien),
- c) Cycloheximid (Wachstumshemmung der Pilze) und
- d) Cycloheximid und Streptomycin (Wachstumshemmung der Pilze und Bakterien) angesetzt.

Die Inhibitoren unterbinden die eukaryotische bzw. prokaryotische Proteinbiosynthese der Organismen

und hemmen somit das Wachstum. Mit der Substrat-induzierten Respiration und selektiven Hemmung konnte außerdem die benötigte Menge an Inhibitoren (100 mg/g_{T_M} Streptomycin und 75 mg/g_{T_M} Cycloheximid) ermittelt werden. In weiterführenden batch-Versuchen wurde die Methode der selektiven Hemmung erprobt, um den jeweiligen Beitrag der Bakterien und Pilze an der N₂O-Bildung zu bestimmen. Den Böden (je 100 g_{T_M}) in den vier Varianten (siehe oben) wurden die selektiven Hemmstoffe in den ermittelten Konzentrationen jedoch ohne Glukose zugeführt. Zur Herstellung denitrifizierender Bodenbedingungen wurde der Wassergehalt auf 60, 70 und 80 % des Porenvolumens (water filled pore space = WFPS) eingestellt und mit NaNO₃ gedüngt (50 mg N/kg). Eine manuelle Beprobung der Gasphase fand 0, 1, 2, 4, 6 und 8 Stunden nach gasdichtem Verschließen der Inkubationsgefäße statt.

An den Proben wurde die N₂O-Konzentration gaschromatographisch gemessen, um die Netto-N₂O-Produktion zu bestimmen. Weiterhin wurde die ¹⁵N-Positionspräferenz im N₂O durch Kryo-Fokussierung mit anschließender Massenspektrometrie (Well & Flessa, 2008) gemessen, um die Hypothese zu prüfen, dass sich die ¹⁵N-Positionspräferenz im N₂O in Abhängigkeit der Produktion durch Pilze oder Bakterien unterscheidet.

Ergebnisse und Diskussion

In allen untersuchten Bodenproben dominierten die Pilze die respiratorische Biomasse, unabhängig von der Landnutzung (Abb. 1).

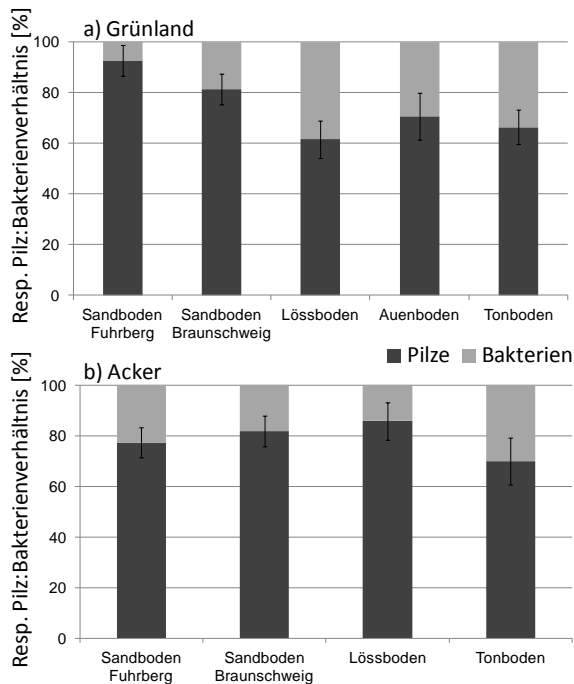


Abb. 1: Respiratorisches Pilz:Bakterienverhältnis [%] ± sd a) im Grünland und b) im Acker (n = 3).

Bei nur drei Böden konnte der erwartete Effekt der Wachstumshemmer auf die N_2O -Bildung bei den vier verschiedenen Varianten beobachtet werden. Bei diesen drei Böden war die N_2O -Bildung mit bakterieller Wachstumshemmung, in dem die Pilze dominieren sollten, höher als in der Variante mit pilzlicher Wachstumshemmung, in dem hingegen die Bakterien dominieren sollten. Die Kontrolle, ohne Wachstumshemmer, erzielte die höchste N_2O -Bildung im Versuchsverlauf und wie erwartet stieg die N_2O -Konzentration im Inkubationsgefäß über die 8 Versuchsstunden an. Bei Anwendung beider Inhibitoren wurde, wie erwartet, die geringste N_2O -Produktion gemessen (Abb. 2). Dies stellt die Restbildung von N_2O dar, die durch Organismen entsteht, deren Proteinbiosynthese nicht von den Inhibitoren betroffen sind oder aber die im Boden aktiv waren, sich aber nicht

in der Wachstumsphase befanden. Archaea sind zum Beispiel nicht von den Inhibitoren betroffen, tragen aber auch zur N_2O -Bildung im Boden bei (Hayatsu et al. 2008).

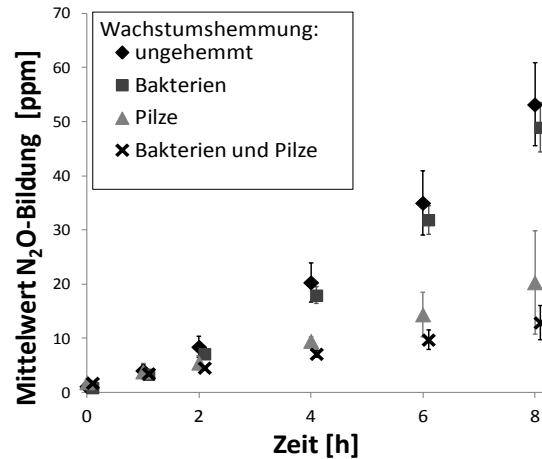


Abb. 2: Mittelwert der N_2O -Bildung [ppm] ± sd der vier Varianten beispielhaft für einen Sandboden (Fuhrberger Feld Acker) mit 70% WFPS (n = 3).

Die ^{15}N -Positionspräferenz nach 8 Versuchsstunden der drei Böden lag bei den Proben im Bereich der Reinkulturen bakterieller Denitrifikation (-10,7 bis 0 ‰) (Abb. 3). Es war kein Unterschied der verschiedenen Varianten mit Anwendung der selektiven Inhibitoren in unseren Versuchen erkennbar. Auch die Variante mit Wachstumshemmer der Bakterien, in dem pilzliche N_2O -Bildung dominieren sollte, liegt bei allen drei Böden im negativen Bereich. Die in Reinkulturen beobachtete stark positive ^{15}N -Positionspräferenz pilzlicher N_2O -Bildung konnte in keiner Variante bestätigt werden. Es bleibt jedoch unklar, in welchem Umfang pilzliche und bakterielle Organismen, deren Wachstum nicht gehemmt war, zu der beobachteten N_2O -Bildung beigetragen haben. Weiterhin liegen keine Informationen über die N_2O -Reduktion in den verschiedenen Varianten vor. Somit könnte diese

auch einen Einfluss auf die ^{15}N -Positionspräferenz in den Gasproben haben.

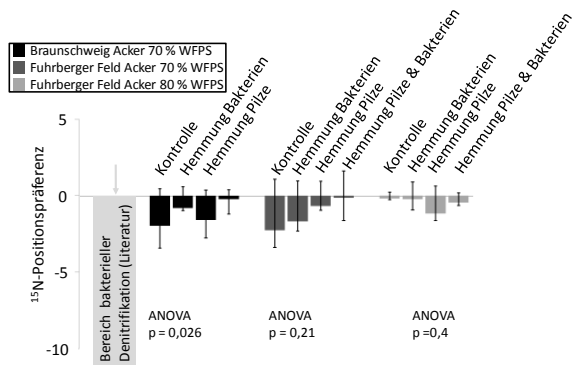


Abb. 3: ^{15}N -Positionspräferenz [%] ± sd der drei Böden mit den verschiedenen Varianten (n = 3). Literaturangaben: Frame & Casciotti 2010, Sutka et al. 2006.

Ausblick

Der Inhibitionsversuch sollte mit dem Ziel weiterentwickelt werden, eine bessere Effektivität der Inhibitoren zu erreichen. Dafür müssen die Organismen zum Wachstum angeregt werden, was durch Zugabe des Substrats Glukose erreicht werden könnte. Weiterhin liegt keine Information über das Ausmaß der N_2O -Reduktion in den Varianten vor. Es ist bekannt, dass die N_2O -Reduktion zu einem Anstieg der ^{15}N -Positionspräferenz im verbleibenden N_2O führt (Well et al. 2006). Außerdem sollte die N_2O -Reduktion unterbunden werden, um eine Überlagerung der Isotopeneffekte der N_2O -Bildung und des N_2O -Verbrauchs zu vermeiden.

Dank

Dieses Projekt wurde finanziert vom Land Niedersachsen.

Literatur

- Anderson, J.P.E., Domsch K.H. (1975): Measurement of bacterial and fungal contributions to respiration of selected agricultural soils. *Can.J.Microbiol.* 21: 314-322.
- Baggs, E.M. (2008): A review of stable isotope techniques for N_2O source partitioning in soils: recent progress, remaining challenges and future considerations. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 22: 1664–1672.
- Frame C-H., Casciotti, L. (2010): Biogeochemical controls and isotopic signatures of nitrous oxide production by a marine ammonia-oxidizing bacterium. *Biogeosciences* 7: 2695–2709.
- Hayatsu, M., Tago, K., Saito, M. (2008): Various players in the nitrogen cycle: Diversity and functions of the microorganisms involved in nitrification and denitrification. *Soil Science and Plant Nutrition* 54: 33–45.
- Heinemeyer, O., Insam, H., Kaiser, E.-A., Walenzik, G. (1989): Soil microbial biomass and respiration measurements: an automated technique based on infra-red gas analysis. *Plant and Soil* 116: 191-195.
- Shoun, H., Kim, D.-H., Uchiyama, H., Sugiyama, J. (1992): Denitrification by fungi. *FEMS Microbiology Letters* 94: 277-282.
- Smith, P., Martiono, D., Cai, Z., Gwary, D., Janzen, H., Kumar, P., McCarl, B., Ogle, S., O'Mara, F., Rice, C., Scholes, B., Sirotenko, O., Howden, M., McAllister, T., Pan, G., Romanenkov, V., Schneider, U., Towprayoon, S., Wattenbach, M., Smith J. (2008): Greenhouse gas mitigation in agriculture. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 363(1492): 789–813.
- Sutka R.L., Ostrom, N.E., Ostrom, P.H., Breznak, J.A., Gandhi, H., Pitt, A.J., Li, F. (2006): Distinguishing Nitrous Oxide Production from Nitrification and Denitrification on the Basis of Isotopomer Abundances. *Applied And Environmental Microbiology*: 638–644.
- Sutka, R.L., Adams, G.C., Ostrom, N.E., Ostrom, P.H. (2008): Isotopologue fractionation during N_2O production by fungal denitrification. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 22: 3989–3996.
- Well R., Kurganova, I., Lopes de Gerenyu, V., Flessa, H. (2006): Isotopomer signatures of soil-emitted N_2O under different moisture conditions—A microcosm study with arable loess soil. *Soil Biology & Biochemistry* 38: 2923-2933.
- Well, R., Flessa, H. (2008): Isotope fractionation factors of N_2O diffusion. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 22: 2621–2628.