

FACULTY OF AGRICULTURAL SCIENCES

Institute of Agricultural Sciences in the Tropics (Hans-Ruthenberg Institute)

University of Hohenheim

Field: Global Food Security

Prof. Dr. Georg Cadisch



**Abundance and diversity of total and nitrifying prokaryotes as influenced
by biochemical quality of organic inputs, mineral nitrogen fertilizer and
soil texture in tropical agro-ecosystems**

Dissertation

Submitted in fulfillment of the requirements for the degree

"Doktor der Agrarwissenschaften"

(Dr.sc.agr. / Ph.D. in Agricultural Sciences)

to the

Faculty of Agricultural Sciences

presented by

Esther Kathini Muema

Kitui, Kenya, 2015

Summary

Tropical agro-ecosystems are limited in nutrient resources as a consequence of i) being composed of highly weathered soils, ii) low native soil organic matter (SOM) content due to conversion of natural forests to arable lands and iii) continuous cropping without replenishing soil nutrients. Recovery of SOM by use of organic residues is faced with other competing uses like animal fodder. Moreover, existing SOM is further reduced by increased turnover rates due to favorable climatic conditions in the tropics. Incorporation of residues is therefore a justified means to restore SOM and to provide crop nutrients through microbial mediated activities like nitrification. Nitrification is a central step of the nitrogen (N) cycle, whereby ammonia is converted into nitrite and then to nitrate by bacteria and archaea through production of the *amoA* gene encoding the α -subunit of the enzyme ammonia monooxygenase. In order to better understand the impact of organic residues of contrasting biochemical quality (i.e., high quality *Tithonia diversifolia* (TD; C/N ratio: 13, lignin: 8.9 %, polyphenols: 1.7 %), intermediate quality *Calliandra calothyrsus* (CC; 13, 13, 9.4) and low quality *Zea mays* (ZM; 59, 5.4, 1.2)) on nutrient provision, effects of residue quality on dynamics of relevant decomposer microbial communities were studied. In addition, mineral N fertilizer was used to compensate for mineral N limitations especially in case of low and intermediate quality residues. Since N is one of the most limiting crop nutrients in the tropics, this study therefore focused on ammonia-oxidizing prokaryotes, using DNA-based quantitative PCR (qPCR) and terminal restriction fragment length polymorphism (TRFLP) techniques. In addition, soil physicochemical properties were measured and linked to the dynamics of microbial communities. The study hypothesized that soil type due to differences in structure and nutrient background, as well as seasonality, which influences soil moisture, would shape the response of the studied communities to biochemical quality of residues.

In the first part of this research project (**chapter two**), the long-term response of abundance and composition of total and ammonia-oxidizing prokaryotes to biochemically contrasting residues and their combination with mineral N fertilizer in a clayey soil was determined. From the results, the abundance of all studied genes was promoted by high quality inputs of TD due to their high amounts of readily available N. However, they were reduced by intermediate quality inputs (CC) which was linked to its high polyphenol and lignin contents. This fact induced N limitation via the formation of polyphenol-protein bonds protecting organic N from microbial decomposition. TD and CC also showed a separation with regards to AOA composition. Low quality maize inputs

(ZM) due to organic N limitation compared to TD decreased the abundance of AOB and total archaeal genes and revealed a separation of AOA and AOB compositions. However, the promotion of AOA abundance by ZM was attributed to its high affinity for ammonia under low N conditions. Residues, regardless of quality, upon combination with mineral N decreased the abundance of communities except AOB and altered their composition apart from AOA. This was attributed to the indirect reduction of soil pH by the fertilizer with AOB abundance being less sensitive to pH changes compared to AOA. The findings suggested residue type and mineral N dependent effects on dynamics of AOB and AOA.

In the second part (**chapter three**), building on the results of first study in the clayey soil, seasonality effects particularly the precipitation were considered. To achieve this, data from two consecutive long rains seasons in years 2012 and 2013 was integrated. Two distinct growth stages (young and flowering) of *Zea mays* were also considered. The results revealed temporal responses of abundance of AOB but not AOA genes to biochemical quality of residues. Generally, a similar trend of organic input effect on AOB abundance as in **chapter two** was revealed, except that ZM increased AOB abundance at flowering stage of maize. This was a confirmation of delayed decomposition of ZM throughout the season as a result of N limitation. Use of N fertilizer or its combination with organic inputs revealed similar results as explained in **chapter two**. This emphasized the lower sensitivity of AOB abundance to pH changes compared to AOA. In addition, precipitation, regardless of residue quality, distinctly influenced all studied genes apart from AOA. Accordingly, AOB and total archaeal abundance increased while that of total bacteria reduced in year 2013 which was drier compared to 2012. It was thus suggested that optimal water filled pore space, which favored proliferation of AOB, was achieved in year 2013. Total archaea were adapted to reduced precipitation while higher precipitation in year 2012 favored the proliferation of total bacteria. Overall, the results suggested that the effects of interrelations of residue quality and seasonality, which also regulate soil moisture, contributed to niche differentiation between AOB and AOA.

In the third component (**chapter four**), a sandy soil texture was considered in addition to clayey soil, which was the focus of the previous two studies. The two contrasting soils showed specific interrelations with SOM with regards to their soil structure as supported by their differences in background soil organic carbon (SOC). It was thus hypothesized that such differences will lead to

distinct effects on dynamics of microbial communities. In clayey soils, apart from high SOC, clay particles form organo-mineral associations, which provide a large surface area for proliferation and protection of microorganisms from predation, favored a higher abundance of AOB and AOA regardless of residue type in this study. On the other hand, sandy soils having a coarse structure providing less protection of freshly added residues from microbial access. Interrelations of sandy texture and quality of organic residues promoted AOB abundance and altered AOA composition. Accordingly, TD (high organic N) and ZM (high organic C) compared to CC with high polyphenol and lignin contents promoted the abundance of AOB and altered AOA composition. Interrelations of the clayey soil with organic residues altered AOB composition. Accordingly, AOB was separated between TD versus ZM and CC versus ZM. These findings implied that AOB was able to access N from CC and that N was the driving force for AOB alterations when C was not limited (clayey soil). On the other hand, AOA composition alteration was only possible when C and N substrates were simultaneously limiting, as in the case of the studied sandy soil. Therefore, soil texture and residues interrelations effects are microbial group specific with AOB being more sensitive compared to AOA.

Overall, the results of this PhD research revealed specific responses of dynamics of AOB and AOA to quality of organic residues and their combinations with mineral N fertilizer. They also revealed effects of interrelations between quality of residues and soil texture as well as seasonality particularly precipitation on dynamics of microbial communities. Future investigation of active microbial communities with the use of RNA-based approaches need to be considered to further improve our understanding of quality of SOM on soil nutrient dynamics.

Zusammenfassung

Tropische Agrarökosysteme haben limitierte Nährstoffressourcen als Folge von i) stark verwitterten Böden, ii) einem niedrigem Gehalt an natürlicher organischer Bodensubstanz (OBS) aufgrund der Konversion von natürlichen Wäldern zu landwirtschaftlicher Nutzfläche und iii) kontinuierlichem Ackerbau ohne ergänzende Nährstoffzufuhr. Die Wiederherstellung der OBS durch Einarbeitung von organischen Ernterückständen steht in Konkurrenz zu anderen Nutzungen wie etwa Tierfutter. Aufgrund der günstigen klimatischen Bedingungen in den Tropen wird darüber hinaus die bestehende OBS durch erhöhte Umsatzraten weiter reduziert. Daher ist für den Wiederaufbau der OBS und von Pflanzennährstoffen, die durch mikrobielle Aktivitäten wie Nitrifikation bereitgestellt werden, die Einarbeitung von Ernterückständen eine zwingende Notwendigkeit. Nitrifizierung ist ein zentraler Schritt im N-Kreislauf, wobei das mineralisierte Ammonium zuerst in Nitrit und danach in Nitrat von Bakterien und Archaeen durch das *amoA* Gen, welches die α -Untereinheit des Enzyms Ammoniummonooxygenase (AMO) codiert, umgewandelt wird. Um die Auswirkungen von Ernterückständen von kontrastierender biochemischer Qualität (d.h., hohe Qualität *Tithonia diversifolia* (TD; C / N-Verhältnis: 13, Lignin: 8.9%; Polyphenole: 1.7%), mittlere Qualität *Calliandra calothyrsus* (CC; 13, 13,4) und niedrige Qualität *Zea mays* (ZM; 59, 5.4, 1.2) auf die Nährstoffverfügbarkeit besser verstehen zu können, wurden die Auswirkungen der Rückstandsqualität auf die Dynamik der relevanten mikrobiellen Zersetzergemeinschaften untersucht. Zusätzlich wurde mineralischer N-Dünger appliziert, um den mineralische N-Mangel zu kompensieren, der vor allem bei Ernterückständen niedriger und mittlerer Qualität auftritt. Da N einer der am meist limitierenden Pflanzennährstoffe in den Tropen ist, konzentriert sich die Studie auf Ammonium-oxidierende Prokaryoten, unter Verwendung von DNA-basierter quantitativer PCR (qPCR) sowie des terminalen Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (TRFLP). Darüber hinaus wurden die physikalisch-chemischen Eigenschaften des Bodens gemessen und mit der Dynamik der mikrobiellen Gemeinschaften verknüpft. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass der Bodentyp, aufgrund von Unterschieden in Struktur und Nährstoffgehalt als auch die Saisonalität, welche die Bodenfeuchte beeinflusst, die Reaktion der untersuchten mikrobiellen Gesellschaften auf die biochemische Qualität der Ernterückstände bestimmen würde.

Im ersten Teil der Forschungsstudie (Kapitel 2) wurde die langfristige Reaktion der Abundanz und Zusammensetzung aller Ammonium-oxidierenden Prokaryoten auf biochemisch kontrastierendes organisches Material und deren Kombination mit mineralischem N Dünger in einem tonigen Boden untersucht. Die Ergebnisse zeigten, dass durch die Zugabe qualitativ hochwertiger organischer Einträge (TD), aufgrund des leicht verfügbaren N, die Abundanz aller untersuchten Gene stimuliert wurde. Bei Zugabe von organischem Material mittlerer Qualität (CC) wurden sie jedoch reduziert, was auf den hohen Polyphenol- und Ligninanteil des zugeführten Materials zurückgeführt werden kann. Durch die Bildung von Polyphenol-Protein-Verbindungen, welche organischen N vor mikrobieller Zersetzung schützen, wird somit ein N-Mangel herbeigeführt. Weiterhin wurde eine unterschiedliche Zusammensetzung der AOA Gemeinschaft bei TD und CC beobachtet. Die Nutzung von Ernterückständen geringer Qualität (ZM) verringerte die Abundanz der AOB und der Gesamtarchaeenpopulation im Vergleich zur Behandlung TD wobei sich außerdem eine unterschiedliche Zusammensetzung der AOA und AOB Gemeinschaften zwischen den beiden Behandlungen ZM und TD zeigte. Die Förderung der AOA Abundanz in Behandlung ZM kann der hohen Affinität der AOA zu Ammonium bei niedrigen N Verhältnissen zugeschrieben werden. Alle Ernterückstände verringerten bei Kombination mit mineralischen N, unabhängig von der Qualität, die Abundanz der untersuchten mikrobiellen Gemeinschaften mit Ausnahme von AOB und veränderten deren Zusammensetzung mit Ausnahme von AOA. Dies wurde auf die indirekte Reduktion des Boden pH-Werts durch den mineralischen Dünger zurückgeführt, basierend auf der Tatsache dass AOB weniger sensibel auf Veränderungen des pH Werts reagiert als AOA. Die Ergebnisse zeigen, dass die Qualität des Ernterückstands und mineralischer N die Dynamik von AOA und AOB beeinflussen.

Aufbauend auf den Ergebnissen der ersten Studie im Lehm Boden, wurden im zweiten Teil (Kapitel 3) die saisonalen Effekte, besonders die Niederschläge, berücksichtigt. Um dies zu erreichen wurden Daten aus zwei aufeinanderfolgenden, langen Regenzeiten der Jahre 2012 und 2013 integriert. Zwei unterschiedliche Wachstumsstadien (junges Stadium und Blütezeit) bei *Zea mays* wurden ebenfalls berücksichtigt. Die Ergebnisse zeigten, dass die biochemische Qualität der Ernterückstände die Abundanz von AOB, aber nicht von AOA Genen temporär beeinflusste. Generell wurde ein ähnlicher Trend des Effekts von organischem Eintrag auf die AOB Abundanz wie in Kapitel 2 deutlich, mit dem Unterschied, dass ZM die AOB Abundanz während der Blütezeit von Mais erhöht hat. Dies war eine Bestätigung für die verzögerte Zersetzung von ZM

während der Saison aufgrund der N Limitierung. Die Verwendung von N-Dünger oder dessen Kombination mit organischen Einträgen ergab ähnliche Ergebnisse wie in Kapitel 2 beschrieben. Dies betonte die geringe Sensitivität der AOB Abundanz zu pH Wert Änderungen im Verleich zu den AOA. Zusätzlich beeinflusste der Niederschlag alle untersuchten Gene mit Ausnahme der AOA, ohne Bezug zur Qualität der Ernterückstände. Im Jahr 2013 konnte, im Vergleich zum Jahr 2012, eine Stimulation der AOB und Gesamtarchaeenpopulation festgestellt werden, während die Gesamtbakterienpopulation zurück ging. Dies wurde mit den geringeren Niederschlägen in 2013 erklärt. Es wurde deshalb angenommen, dass das Optimum der wassergefüllten Poren (WFPS), welches die Ausbreitung der AOB begünstigte, im Jahr 2013 erreicht wurde. Die Gesamtarchaeenpopulation war an geringere Niederschläge angepasst, wobei höhere Niederschläge im Jahr 2012 die Ausbreitung der Gesamtbakterienpopulation begünstigte. Insgesamt zeigten die Ergebnisse, dass die Wechselbeziehung von Ernterückstandsqualität und Saisonalität, die auch die Bodenfeuchte reguliert, zu einer Nischendifferenzierung zwischen AOB und AOA beitrug.

Im dritten Teil dieser Forschungsarbeit (Kapitel 4) wurde zusätzlich zum tonigen Boden, der in den vorangegangenen Studien untersucht wurde, ein sandiger Boden miteinbezogen. Die beiden kontrastierenden Böden zeigten spezifische Wechselbeziehungen mit der OBS hinsichtlich ihrer Bodenstruktur, begünstigt durch ihren unterschiedlichen Gehalt an organischem Bodenkohlenstoff (SOC). Es wurde daher die Hypothese aufgestellt, dass diese Unterschiede eine deutliche Auswirkung auf die Dynamik der mikrobiellen Gemeinschaften haben. In lehmigen Böden bilden Tonpartikel organisch-mineralische Verbindungen mit großen Oberflächen, die die Vermehrung von Mikroorganismen und deren Schutz vor Prädatoren begünstigen. Diese Tatsache resultierte in dieser Studie in einer höheren Abundanz der AOA und AOB unabhängig vom Ernterückstandstyp. Andererseits haben sandige Böden eine grobe Struktur und bieten für frisch hinzugefügtes organisches Material einen geringeren Schutz vor mikrobiellem Zugriff. Wechselwirkungen zwischen der sandigen Bodentextur und der Qualität der organischen Rückstände förderten die AOB Abundanz und veränderten die AOA Zusammensetzung. Dementsprechend förderten TD (hoher organischer N-Gehalt) und ZM (hoher organischer C-Gehalt), im Vergleich zu CC mit hohem Polyphenol- und Ligningehalt, die Abundanz von AOB und veränderten die AOA Zusammensetzung. Wechselwirkungen des lehmigen Bodens mit organischen Ernteresten veränderten die AOB Zusammensetzung. Dementsprechend zeigte sich eine Veränderung der

AOB Zusammensetzung zwischen den Varianten TD und ZM und zwischen CC und ZM. Diese Ergebnisse implizierten, dass AOB auf N von CC zugreifen konnte und dass N die treibende Kraft der veränderten AOB Zusammensetzung unter nicht limitierenden C Bedingungen (Lehmboden) war. Im Gegensatz hierzu war die Veränderung der AOA Zusammensetzung nur möglich, wenn C und N Substrate gleichzeitig limitierend waren, wie im Fall des untersuchten Sandbodens. Daher sind Wechselwirkungen zwischen Bodentextur- und Ernterückstandseffekten spezifisch für die mikrobielle Gruppe, wobei AOB sensitiver als AOA reagiert.

Insgesamt offenbaren die Ergebnisse dieser Doktorarbeit spezifische Reaktionen der Dynamik von AOB und AOA auf die Qualität von organischen Ernterückständen und deren Kombinationen mit mineralischen N-Dünger. Sie zeigt auch Auswirkungen der Wechselbeziehungen zwischen der Qualität der Ernterückständen und Bodenbeschaffenheit als auch der Saisonabhängigkeit, insbesondere Niederschlag, auf die Dynamik mikrobieller Gemeinschaften. Zukünftige Untersuchungen der aktiven mikrobiellen Gemeinschaften durch Verwendung von RNA-basierten Ansätzen müssen in Betracht gezogen werden, um unser Verständnis für den Einfluss der OBS-Qualität auf die Bodennährstoffdynamik weiter zu verbessern.