



Doctoral Thesis

Field techniques for the quantification of microbial methane oxidation in the subsurface

Author(s):

Urmann, Karina

Publication Date:

2006

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-005318787> →

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. 16721

Field Techniques for the Quantification of Microbial Methane Oxidation in the Subsurface

A dissertation submitted to the
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZURICH

for the degree of
Doctor of Natural Sciences

presented by

KARINA URMANN

Master of Science in Environmental and Ecological Sciences, University of Lancaster, UK

born 28.03.1978

citizen of Germany

accepted on the recommendation of

Prof. Josef Zeyer, examiner

Prof. Michael Kreuzer, co-examiner

Dr. Martin Schroth, co-examiner

Dr. Rolf Siegwolf, co-examiner

Zurich 2006

Summary

Methane (CH₄) is the second most important greenhouse gas after carbon dioxide (CO₂). To understand the factors that influence CH₄ emissions, it is important to quantify microbial processes involved in the turnover of CH₄ in the subsurface. Microbial CH₄ oxidation under aerobic conditions is a key process decreasing CH₄ emissions from different environments such as wetlands, peat bogs and contaminated aquifers. Quantification of microbial processes in situ is important to overcome biases inherent in laboratory studies and therefore to obtain rates or rate constants that may be more relevant under field conditions.

The objective of this thesis was to develop a new in-situ method, the gas push-pull test (GPPT), for the quantification of microbial CH₄ oxidation in the vadose zone. This new method was combined with concentration profile and stable carbon isotope analysis and molecular tools. It was applied in the vadose zone above a contaminated aquifer in Studen, Switzerland and in an alpine peat bog in Eigenthal, Switzerland. To complement the field studies, a laboratory model system was designed to study CH₄ oxidation in a CH₄/O₂ counter-gradient under controlled conditions.

In a field-scale feasibility study, the GPPT was successfully applied to quantify microbial CH₄ oxidation in the vadose zone above the contaminated aquifer. The GPPT consists of the injection of a gas mixture of reactants (e.g. CH₄, O₂) and non-reactive tracer gases (e.g. Ne, Ar) into the vadose zone and the subsequent extraction of the injected gas mixture together with soil air from the same location. Rate constants of CH₄ oxidation are calculated from breakthrough curves of extracted reactants and tracers. Co-injection of a specific inhibitor for methanotrophic bacteria (acetylene) showed that Ne was a suitable tracer for CH₄ under the restricted gas transport conditions at this site and that the observed CH₄ oxidation was microbially mediated. The latter was also confirmed by a large shift in CH₄ stable carbon isotope ratios of up to 42.6‰.

At the same site, Michaelis-Menten parameters for CH₄ oxidation were estimated using GPPTs with a range of CH₄ injection concentrations. The apparent maximum activity V_{max} was an order of magnitude higher at 2.7 m below soil surface, close to the groundwater table ($0.70 \pm 0.15 \text{ mmol CH}_4 \text{ (L soil air)}^{-1} \text{ h}^{-1}$) than at 1.1 m depth ($0.076 \pm 0.006 \text{ mmol CH}_4 \text{ (L soil air)}^{-1} \text{ h}^{-1}$). Conversely, values for the apparent affinity constant K_m were in a similar range at both depths. At 2.7 m, the apparent first-order rate constant k ($2.0 \pm 0.03 \text{ h}^{-1}$) calculated from GPPTs agreed well with the k of 1.9 h^{-1} estimated from CH₄ gas concentration profiles. At both depths, known methanotrophic species that may contribute to the observed CH₄

oxidation were detected by cloning and sequencing. Stable carbon isotope fractionation factors for CH₄ oxidation determined during GPPTs ranged from 1.006 to 1.032. The observed variability may complicate the use of stable isotopes as an independent quantification method.

For application in the peat bog, the GPPT was adapted as noble gases are not suitable as tracers for CH₄ under diffusion-dominated transport conditions due to differing diffusion coefficients. We showed that the reactant CH₄ can be used as a substitute tracer by performing two consecutive GPPTs and co-injecting acetylene (C₂H₂) as an inhibitor in the second test. Applying this procedure, apparent first-order rate constants for CH₄ oxidation from 0.38 to 0.82 h⁻¹ were quantified in the unsaturated zone of the peat bog. In this highly porous system, stable carbon isotopes were suitable only to a limited extent as independent indicators of microbial CH₄ oxidation.

To complement the field studies, we designed a laboratory column to study CH₄ oxidation in diffusional CH₄/O₂ counter-gradients in unsaturated porous media. Analysis and simulations of the steady-state CH₄, CO₂ and O₂ gas profiles showed that in a 15-cm-deep active zone, CH₄ oxidation followed first-order kinetics with respect to CH₄ with a high apparent first-order rate constant of 30 h⁻¹. The methanotrophic community responded rapidly to changing substrate availability induced by changes in O₂ concentration at the top of the column. A ~7‰ enrichment in CH₄ stable carbon isotope ratios along profiles confirmed microbial CH₄ oxidation. A high fractionation factor of 1.025 ± 0.0005 for microbial oxidation estimated from this shift was corroborated by simulations.

In conclusion, in this thesis we demonstrated that the gas push-pull test is a valuable field method for the quantification of in-situ and potential microbial CH₄ oxidation in the vadose zone. Quantification of this process was successful in two environments with very different physical characteristics. In addition to field quantification, the designed laboratory model system was valuable for investigating response of methanotrophs to environmental parameters under controlled conditions.

Zusammenfassung

Methan ist nach Kohlendioxid das zweitwichtigste Treibhausgas. Um Einflussfaktoren auf Methanemissionen zu verstehen, ist es wichtig mikrobielle Prozesse die im Untergrund am Umsatz von Methan beteiligt sind zu quantifizieren. Mikrobielle Methanoxidation unter aeroben Bedingungen ist der wichtigste Prozess, der Methanemissionen aus verschiedenen Ökosystemen wie Feuchtgebieten, Mooren und kontaminierten Grundwasserleitern, vermindert. Da Umweltbedingungen, wie sie im Feld vorherrschen, im Labor nicht vollständig nachempfunden werden können, ist es wichtig mikrobielle Prozesse vor Ort zu quantifizieren um unter Feldbedingungen relevante Raten(koeffizienten) zu erhalten.

Das Ziel dieser Arbeit war eine neue Feldmethode zur Quantifizierung von Methanoxidation in der ungesättigten Zone, den Gas Push-Pull Test (GPPT), zu entwickeln. Diese neue Methode wurde mit der Analyse von Konzentrationsprofilen und stabilen Isotopen sowie mit molekularen Methoden kombiniert. Die Methode wurde in der ungesättigten Zone über einem kontaminierten Grundwasserleiter in Studen (Schweiz) und in einem alpinen Hochmoor in Eigenthal (Schweiz) angewendet. Zur Ergänzung der Feldstudien wurde ein Labormodelsystem entwickelt um Methanoxidation in Methan/Sauerstoff Gegengradienten unter kontrollierten Bedingungen zu untersuchen.

In einer Machbarkeitsstudie im Feld wurde der GPPT erfolgreich für die Quantifizierung von Methanoxidation in der ungesättigten Zone über dem kontaminierten Grundwasserleiter eingesetzt. Der GPPT besteht aus der Injektion eines Gasgemisches aus Substraten (z.B. Methan und Sauerstoff) und inerten Tracergasen (z.B. Neon und Argon) in die ungesättigte Zone und der darauf folgenden Extraktion des injizierten Gasgemisches gemeinsam mit Bodenluft vom gleichen Ort. Ratenkoeffizienten für Methanoxidation werden aus Durchbruchkurven von extrahierten Substraten und Tracergasen berechnet. Die gleichzeitige Injektion eines spezifischen Inhibitors für methanotrophe Bakterien (Acetylen) hat gezeigt dass Neon unter den spezifischen Standortbedingungen mit eingeschränktem Gastransport ein geeigneter Tracer für Methan war und dass der beobachtete Methanumsatz auf einen mikrobiellen Prozess zurückzuführen war. Letzteres wurde durch eine beträchtliche Verschiebung im stabilen Isotopenverhältnis von bis zu 46.2‰ bestätigt.

Am gleichen Standort wurden Michaelis-Menten Parameter für Methanoxidation aus einer Serie von GPPTs mit verschiedenen Methaninjektionskonzentrationen abgeschätzt. In 2.7 m Tiefe, nahe dem Grundwasserspiegel, lag die maximale Aktivität, V_{max} (0.70 ± 0.15 mmol CH_4 (L Bodenluft) $^{-1} \text{h}^{-1}$), eine Größenordnung über V_{max} in 1.1 m Tiefe (0.076 ± 0.006 mmol

CH_4 (L Bodenluft) $^{-1} \text{ h}^{-1}$). Umgekehrt lagen die Werte für die Affinitätskonstante K_m in beiden Tiefen in einem ähnlichen Bereich. In 2.7 m Tiefe stimmten der aus GPPTs berechnete ($2.0 \pm 0.03 \text{ h}^{-1}$) und der aus Konzentrationsprofilen abgeschätzte (1.9 h^{-1}) Ratenkoeffizient erster Ordnung gut überein. In beiden Tiefen wurden durch Klonierung und Sequenzierung bekannte methanotrophe Spezies gefunden, die zur beobachteten Methanoxidation beitragen könnten. Aus GPPTs bestimmte Fraktionierungsfaktoren für stabile Kohlenstoffisotope während der Methanoxidation reichten von 1.006 bis 1.032. Diese hohe Variabilität könnte die Verwendung von Isotopenfraktionierung als unabhängige Quantifizierungsmethode erschweren.

Für die Anwendung an dem Moorstandort, wurde der GPPT angepasst, da Edelgase unter durch Diffusion dominierten Transportbedingungen keine geeigneten Tracer für Methan sind. Wir konnten zeigen dass durch die Durchführung zweier aufeinanderfolgender Tests und die gleichzeitige Injektion von Acetylen als Inhibitor im zweiten Test, das Substrat Methan als Ersatztracer verwendet werden kann. Mit dieser Methode wurden Ratenkoeffizienten erster Ordnung im Bereich von 0.38 bis 0.82 h^{-1} in der ungesättigten Zone des Moors quantifiziert. In diesem hochporösen System waren stabile Kohlenstoffisotope nur in begrenztem Maß als unabhängige Indikatoren für Methanoxidation geeignet.

Zur Ergänzung der Feldstudien wurde eine Laborsäule entwickelt um Methanoxidation in Methan/Sauerstoff Gegengradienten in ungesättigten porösen Medien zu untersuchen. Analysen und Simulationen von Methan-, Kohlendioxid- und Sauerstoffprofilen unter Gleichgewichtsbedingungen zeigten dass die Methanoxidation in einer 15-cm-tiefen Zone einer Kinetik erster Ordnung mit einem hohen Ratenkoeffizienten von 30 h^{-1} folgte. Die methanotrophe Population reagierte schnell auf Änderungen der Substratverfügbarkeit die durch Änderungen der Sauerstoffkonzentration am oberen Ende der Säule herbeigeführt wurden. Eine Anreicherung im stabilen Kohlenstoffverhältnis im CH_4 um $\sim 7\%$ entlang des Profils bestätigte den mikrobiellen Methanumsatz. Simulationen bestätigten den hohen Fraktionierungsfaktor von 1.025 ± 0.0005 der aus dieser Verschiebung berechnet wurde.

Zusammenfassend konnten wir in dieser Arbeit zeigen dass der Gas Push-Pull Test eine nützliche Feldmethode ist um in-situ und potentielle Methanoxidation in der ungesättigten Zone zu quantifizieren. Die Quantifizierung dieses Prozesses konnte an zwei Standorten mit sehr unterschiedlichen physikalischen Eigenschaften erfolgreich durchgeführt werden. In Ergänzung zu den Feldstudien war das entwickelte Labormodelsystem wertvoll um die Reaktion von methanotrophen Bakterien auf Umweltparameter unter kontrollierten Bedingungen zu untersuchen.