



Doctoral Thesis

A field-scale approach to link microbial community structure and function in a petroleum hydrocarboncontaminated aquifer

Author(s):

Pombo, Silvina Andrea

Publication Date:

2005

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-005011590> →

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](#).

Doctoral Thesis ETH No. 15960

**A field-scale approach to link microbial community
structure and function in a petroleum hydrocarbon-
contaminated aquifer**

A dissertation submitted to the

SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZURICH

for the degree of

Doctor of Natural Sciences

Presented by

SILVINA ANDREA POMBO

Microbiologist, Universidad Nacional de Rio Cuarto, Argentina

born 15.05.1974

citizen of Argentina

Accepted on the recommendation of

Prof. Josef Zeyer, examiner

Prof. Leo Eberl, co-examiner

Dr. Martin Schroth, co-examiner

2005

Summary

Microorganisms play an important role in ecologically relevant processes such as the degradation of contaminants and the cycling of nutrients. To understand these processes it is of great interest to study the number and diversity of microorganisms involved (microbial community structure) as well as their function. One of the current challenges in microbial ecology is to find methods to simultaneously study and link microbial community structure with function, particularly at the field scale. The aim of this thesis was to apply a combination of tools at the field scale to determine the identity of microorganisms carrying out various processes in a petroleum hydrocarbon-contaminated aquifer, while at the same time quantifying the rates at which the processes occur.

One of the approaches applied to link microbial community structure with function was the stable isotope labeling of phospholipid-derived fatty acids (PLFA) and archaeal lipids. This was achieved using ^{13}C -labeled organic substrate during a single-well push-pull test (PPT). Firstly, a study was conducted to determine the feasibility of labeling active suspended microbial populations. The process targeted was acetate degradation under denitrifying conditions because nitrate reduction is an energetically favorable process with a high percentage of carbon assimilation. Significant ^{13}C -incorporation in dissolved inorganic carbon (DIC) and PLFA was detected as early as 4 h after injection, showing that acetate was biologically oxidized and incorporated into the biomass. Profiles of enriched PLFA and fluorescent in situ hybridization (FISH) analysis suggested the presence of active denitrifiers. Thereafter we applied the same approach to follow $[2\text{-}^{13}\text{C}]$ acetate mineralization in the field through two different processes: oxidation coupled to sulfate reduction and acetoclastic methanogenesis. The latter are strictly anaerobic processes of lower energy yield than nitrate reduction. We also extended the analysis to microorganisms attached to the aquifer matrix. Enrichment in ^{13}C of DIC and methane provided unequivocal evidence that sulfate reduction and methanogenesis occurred simultaneously at high concentrations of both electron donor and sulfate. The ^{13}C -labeling of PLFA was significant in both water and aquifer matrix samples. The PLFA labeling patterns and FISH analyses of groundwater and aquifer matrix samples suggested that the main sulfate-reducing bacteria degrading the acetate were *Desulfotomaculum acetoxidans* and *Desulfobacter* sp. among the suspended populations, and *D. acetoxidans* among the attached populations. Furthermore, we compared the enrichment of archaeal lipids during the acetoclastic methanogenesis previously described with a complementary experiment based on $\text{H}^{13}\text{CO}_3^-$ reduction. Methanogenesis was confirmed in both experiments by ^{13}C -enrichment of CH_4 . The isoprenoid i20:0 was the only archaeal marker detected in groundwater and aquifer matrix samples. However significant ^{13}C -enrichment of i20:0 was only found in the sediment samples of the ^{13}C -acetate experiment. Finally we explored the feasibility of conducting a PLFA labeling experiment with ^{13}C -labeled toluene. However, preliminary experiments showed that toluene strongly partitions between the water phase and the non-aqueous phase liquid (NAPL) and a retardation factor for toluene with respect to the tracer could not be estimated. Furthermore, we were unable to detect microbial

transformation of toluene using isotopic data. Therefore the experiment with ^{13}C -labeled toluene was not performed.

We also performed a series of push-pull tests to measure the activity and diversity of methanogenic *Archaea* using other tools than isotope labeling. Acetate, formate, H_2/CO_2 and methanol were used to assess the activity of different methanogenic *Archaea* groups. Microbial community structure was determined using FISH, denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) of 16S rDNA amplified with the *Archaea*-specific primer set, and sequencing of DNA from dominant DGGE bands. The PPT results agreed with the molecular analysis. High H_2 and formate consumption rates were linked with the presence of several members of the *Methanomicrobiaceae* and acetate consumption agreed with the presence of sequences and detection of bacteria related to *Methanosaeta concilii* using FISH.

In conclusion, in this thesis using a combination of methods we were able to detect and quantify microbial activities at the field scale and link them with the microbial populations involved. In particular the use of labeled compounds is a sensitive tool that used in combination with hydrological, chemical and molecular tools provides us with new insights in the interrelation of processes occurring in a PHC contaminated aquifer.

Zusammenfassung

Mikroorganismen spielen eine wichtige Rolle beim Abbau von Schadstoffen in der Umwelt und dem Nährstoffkreislauf. Um diese Prozesse zu verstehen, sind Untersuchungen zu Anzahl und Diversität der involvierten Mikroorganismen (mikrobielle Populationsstruktur), sowie ihrer Funktion von grossem Interesse. Eine der grossen aktuellen Herausforderungen in der mikrobiellen Ökologie ist die Entwicklung von Methoden zur simultanen Untersuchung und Verknüpfung der Populationsstruktur von Mikroorganismen und deren Funktion. Das Ziel dieser Dissertation war die Anwendung einer Kombination von verschiedenen Methoden im Feldmassstab zur Identifizierung von Mikroorganismen, die verschiedene Prozesse in einem mit Mineralölkohlenwasserstoffen kontaminierten Grundwasserleiter ausführen. Gleichzeitig sollten die Raten quantifiziert werden, mit welcher diese Prozesse ablaufen.

Einer der Ansätze, um die Verbindung zwischen Populationsstruktur von Mikroorganismen und deren Funktion herzustellen, beinhaltet die Markierung von Phospholipid-Fettsäuren (PLFA) und Lipiden von *Archaea* mit stabilen Isotopen. Dies wurde unter Einsatz von ^{13}C -markiertem organischem Substrat in einem „Single-Well Push-Pull“ Experiment in einem Grundwasserleiter realisiert. Als erstes wurde eine Machbarkeitstudie zur Markierung von aktiven Populationen von Grundwasserbakterien durchgeführt. Der angepeilte Prozess war der Abbau von $[2-^{13}\text{C}]$ Acetat unter denitrifizierenden Bedingungen, da die Reduktion von Nitrat ein energetisch bevorzugter Prozess mit hohem Prozentsatz an Kohlenstoff-Assimilation darstellt. Vier Stunden nach der Injektion konnte eine signifikante ^{13}C -Anreicherung im gelösten inorganischen Kohlenstoff (DIC) und in den PLFA suspendierter Bakterien nachgewiesen werden. Damit konnte die biologische Oxidation von Acetat und dessen Einbau in die Biomasse gezeigt werden. Die Profile der angereicherten PLFA und Analysen mit Fluoreszenz in-situ Hybridisierung (FISH) deuteten auf die Anwesenheit aktiver Denitrifizierer hin. Als nächstes wandten wir den gleichen Ansatz an auf die Mineralisation von $[2-^{13}\text{C}]$ Acetat durch zwei unterschiedliche Prozesse: Oxidation verbunden mit Sulfatreduktion und acetoklastische Methanogenese. Diese Prozesse sind strikt anaerob und weisen eine tiefere energetische Ausbeute als Nitratreduktion auf. Die Analyse wurde auch auf Mikroorganismen ausgeweitet, welche mit der Grundwassermatrix assoziiert sind. Die Anreicherung von ^{13}C im DIC und in Methan zeigte klar, dass Sulfatreduktion und Methanogenese bei hoher Konzentration von Elektronendonator und Sulfat gleichzeitig ablaufen. Die ^{13}C -Markierung der PLFA war sowohl in den Wasser- als auch in den Matrixproben signifikant. Profile der PLFA-Markierung und FISH Analysen von Wasser und Matrix lieferten Hinweise auf die wichtigsten sulfatreduzierenden Bakterien während des Abbaus von Acetat. Für die suspendierten Populationen waren dies *Desulfotomaculum acetoxidans* und *Desulfobacter* sp. und für die mit der Matrix assoziierten Populationen *D. acetoxidans*. Weiter verglichen wir die Anreicherung der Lipide von *Archaea* während der acetoklastischen Methanogenese mit einem komplementären $\text{H}^{13}\text{CO}_3^-$ Reduktions – Experiment. Methanogenese konnte in beiden Experimenten durch die Anreicherung von ^{13}C in Methan

nachgewiesen werden. Das Isoprenoid i20:0 war der einzige Marker von *Archaea*, welche in Wasser- und Matrixproben detektiert wurde. Eine signifikante ^{13}C -Anreicherung von i20:0 konnte allerdings nur in den Matrixproben des ^{13}C -Acetat Experimentes gefunden werden. Zum Schluss untersuchten wir die Durchführbarkeit eines PLFA - Markierungsexperimentes mit ^{13}C -markiertem Toluol. In den Vorexperimenten konnte allerdings gezeigt werden, dass Toluol sich stark in die ölige Flüssigphase rüchließt. Ein Retardationsfaktor relativ zum konservativen Tracer konnte daher für Toluol nicht abgeschätzt werden. Es war uns auch nicht möglich, mikrobiellen Abbau von Toluol mit Isotopendaten zu detektieren. Das Experiment mit ^{13}C -markiertem Toluol wurde daher im Feld nicht durchgeführt.

Mit einer Serie von Push-Pull Experimenten untersuchten wir die Aktivität und Diversität methanogener *Archaea* unter Verwendung anderer Methoden ohne Isotopenmarkierung. Um die Aktivität verschiedener Gruppen von *Archaea* zu bestimmen, wurden Acetat, Format, H_2/CO_2 und Methanol verwendet. Die mikrobielle Populationsstruktur wurde mittels FISH-Analyse, Denaturierender Gradienten-Gelelektrophorese (DGGE) der 16S rDNA, welche mit einem *Archaea*-spezifischen Primerset amplifiziert wurde, und Sequenzierung der DNA aus dominanten DGGE Banden bestimmt. Es konnte eine Übereinstimmung zwischen den Resultaten der Push-Pull Experimente und der molekularen Analyse festgestellt werden. Hohe H_2 - und Format-Verbrauchsdaten konnten mit dem Auftreten verschiedener Vertreter von *Methanomicrobiaceae* assoziiert werden. Der Acetat-Verbrauch stimmte mit dem Auftreten der Sequenzen und der FISH-Detektion eines mit *Methanosaeata concilii* verwandten Bakteriums überein.

Diese Arbeit zeigt, dass es durch die Anwendung einer Kombination verschiedener Methoden möglich war, mikrobielle Aktivität im Feldmassstab zu detektieren, zu quantifizieren und damit gleichzeitig einen Zusammenhang zur involvierten mikrobiellen Population herzustellen. Insbesondere die Anwendung von markierten Substanzen repräsentiert einen sensitiven Ansatz, welcher in Kombination mit hydrologischen, chemischen und molekularen Methoden neue Einblicke in die Wechselbeziehungen von Prozessen in mit Mineralölkohlenwasserstoffen kontaminierten Grundwasserleitern gewährt.