

Mit großem Bohrer auf der Jagd nach den kleinsten Lebewesen – wissenschaftliches Bohren für geomikrobiologische Forschung

Jens Kallmeyer

Deutsches GeoForschungsZentrum GFZ, Potsdam

With the rapidly increasing utilization of the subsurface, either for exploitation of natural resources or long-term storage of waste products, it is of paramount importance to understand this so far understudied environment. Over the last two decades new findings have shown that microbes mediate many processes that were previously considered as abiotic. Exploration of the so-called Deep Biosphere is only possible through drilling. With regard to drilling operations and sample processing, microbiology has different requirements than many other scientific disciplines, the most important one being contamination control because drilling fluid tends to infiltrate the drill core and renders the material unsuitable for microbiological analyses. There are different ways to assess the infiltration of drill fluid, each one has its specific advantages and disadvantages. Another important aspect of deep biosphere research is the necessity to process samples as quickly as possible after retrieval to avoid any changes in the microbial community. These requirements add some complications to drilling operations, therefore the addition of a geomicrobiological component is not always appreciated by all members of a science party. However, knowledge about the drivers of diagenetic processes and accurate assessment of the contamination of the core by drilling fluids are valuable information for other disciplines as well.



Gemeinhin wird unter dem Begriff „Biosphäre“ die Tier- und Pflanzenwelt auf dem Land und im Meer verstanden, also das Leben auf der Erde. Bis zu 20% des in lebenden Organismen gespeicherten Kohlenstoffs findet sich aber in Mikroben, die tief in der Erde leben – die sogenannte „tiefe Biosphäre“. In den letzten zwanzig Jahren hat sich die Erforschung des Lebens im tiefen Untergrund von einem Nischenthema zu einer wichtigen Forschungsrichtung entwickelt. Über viele Jahre lag der Fokus auf der Erforschung der tiefen marinen Biosphäre, also des Lebens im Meeresboden. In den letzten Jahren gab es jedoch vermehrt Forschungsprojekte im terrestrischen Bereich. Neben klassischen Bohrungen von der Erdoberfläche in die Tiefe werden bei der Erforschung der terrestrischen tiefen Biosphäre auch alternative Möglichkeiten genutzt, die im marinen Bereich nicht möglich sind. So wird beispielsweise innerhalb von Minen horizontal gebohrt. Diese Technik hat z. B. den Vorteil, dass wesentlich kürzere Strecken gebohrt werden müssen.

Neue Forschungsergebnisse belegen, dass die tiefe Biosphäre für viele gesellschaftliche Bereiche relevant ist. Von einer Reihe von Prozessen, die früher als rein chemisch angesehen wurden, ist heute bekannt, dass sie von Mikroorganismen katalysiert werden. Zudem wird der tiefe Untergrund inzwischen wesentlich stärker als früher wirtschaftlich genutzt. Neben der Gewinnung von Rohstoffen wird die Speicherung von Energieträgern oder Abfallstoffen im Untergrund zunehmend diskutiert. Ohne eine genaue Kenntnis der biologischen Prozesse im Untergrund lassen sich aber keine verlässlichen Aussagen über die Langzeitstabilität solcher Systeme treffen.

Auf der wissenschaftlichen Seite beschäftigen sich zwei internationale Programme mit der Erforschung des tiefen Untergrunds durch Bohrungen, das landbasierte Internationale

Kontinentale Wissenschaftliche Bohrprogramm (International Continental Drilling Program, ICDP), das am Deutschen GeoForschungsZentrum GFZ koordiniert wird, und das Tiefseebohrprogramm International Ocean Discovery Program (IODP).

Seit etwa zehn Jahren beteiligt sich das GFZ an Forschungsprojekten zur tiefen Biosphäre: von marinen Bohrungen im Rahmen von IODP und seinen Vorläufern (*Horsfield et al., 2006; Mangelsdorf et al., 2011*), über terrestrische Bohrungen im Rahmen von ICDP (*Bischoff et al., 2013; Glombitza et al., 2013*) und anderen Programmen (*Fry et al., 2009*), im Permafrost (*Mangelsdorf et al., 2005*) und in tiefen südafrikanischen Goldminen (*Lippmann et al., 2003*). Neben diesen eher im Bereich der Grundlagenforschung angesiedelten Forschungsprojekten werden stets auch anwendungsbezogene Fragestellungen bearbeitet, z. B. im Bereich der CO₂-Speicherung im Untergrund (*Wandrey et al., 2010*) oder zur Erforschung von Prozessen in geothermischen Anlagen. Ziel ist es, ein grundlegendes Verständnis der tiefen Biosphäre hinsichtlich ihrer Stoffdynamik und der daran beteiligten Mikroorganismengemeinschaften zu erlangen, um deren generelle Bedeutung für die globalen Stoffkreisläufe abschätzen zu können.

Geomikrobiologische Forschung in der tiefen Biosphäre

Mit Ausnahme von extrem nährstoffarmen marinen Sedimenten ist die tiefe Biosphäre ein sauerstofffreier (anoxischer) Lebensraum. Die dort lebenden Organismen sind nicht nur auf ein Leben ohne Sauerstoff eingestellt, für sie ist er sogar extrem schädlich. Aus diesem Grund müssen Proben möglichst komplett von der Umgebungsluft isoliert genommen, gelagert und verarbeitet werden (Bild links und Abb. 3), was einen hohen logistischen Aufwand mit sich bringt (Abb. 3) oder viel Improvisation erfordert (Abb. 1 rechts). Das Leben in der tiefen Biosphäre läuft zudem auf Zeitskalen ab, die für Menschen nur schwer vorstellbar sind. Während sich eine Mikrobenezelle im Labor mehrmals in der Stunde teilt, teilt sich eine Zelle in der tiefen Biosphäre unter Umständen nur einmal alle hunderte von Jahren. Viele Standardtechniken der klassischen Mikrobiologie lassen sich nicht auf die tiefe Biosphäre anwenden, weil sie nicht empfindlich genug sind, um die extrem geringen Umsatzraten und Zelldichten zu detektieren.

Links: Viele Organismen der tiefen Biosphäre sind nicht nur auf ein Leben ohne Sauerstoff eingestellt, für sie ist er sogar extrem schädlich. Daher muss eine Beprobung unter sauerstofffreien Bedingungen erfolgen, wie hier in einer mit Stickstoff gefüllten Glovebox. Über die angesetzten Handschuhe können Arbeiten am Bohrkern durchgeführt werden. (Foto: J. Kallmeyer, GFZ)

Left: Many deep biosphere organisms are not only adapted to a life without oxygen, it is even toxic to them. Therefore, sampling has to be carried out in an oxygen-free atmosphere, like here inside a nitrogen-filled glovebox. Through the gloves it is possible to work on the drill core.



Kontakt: J. Kallmeyer
(jens.kallmeyer@gfz-potsdam.de)



Abb. 1: Im Rahmen des ICDP-Projekts am Vansee, Türkei, wurde auch eine geomikrobiologische Beprobung durchgeführt. Links: schwimmende Bohrplattform; rechts: Schnelligkeit ist wichtig, da die wertvollen Proben sonst nicht mehr verwendbar sind. Um Zeit zu sparen wird die Fensterbank des Hotelzimmers kurzerhand als mobiles Labor genutzt. (Fotos: Kallmeyer, GFZ)

Fig. 1: As part of the ICDP Project at Lake Van, Turkey, samples were taken for geomicrobiological research. Left: the swimming drilling platform. Right: Because the transport of GFZ's mobile geomicrobiology laboratory was delayed, scientists processed the sample on the window sill of the hotel. Rapid sample processing is very important to prevent the precious samples from decay.

Schmutziges Bohren für saubere Mikrobiologie

Alle Arbeiten in der tiefen Biosphäre beruhen auf Bohrungen (Abb. 1 links). Selbst bei der Arbeit in Minen muss einige Meter in das Anstehende gebohrt werden, um Proben zu gewinnen, die nicht durch Sauerstoff oder fremde Lebewesen von der Oberfläche kontaminiert sind. Bohren im Gestein ist unter geobiologischem Gesichtspunkt eine eher schmutzige Angelegenheit. Große Mengen an Flüssigkeit müssen durch das Bohrloch gepumpt werden, um das ausgebohrte Material aus dem Loch zu befördern und um den Bohrer zu kühlen.

Je nach Bohrtechnik, der Tiefe des Bohrlochs und anderen Parametern besteht die sogenannte Spülung aus verschiedenen Substanzen. Im für die Mikrobiologie günstigsten Fall wird als Spülung reines Wasser verwendet. Aber selbst dann besteht normalerweise nicht die Möglichkeit einer kompletten Sterilisation des Wassers, da die eingesetzten Mengen von mehreren Tausend Litern pro Stunde zu groß sind. Während

bei Bohrungen im Meer oder in Seen die Bohrflüssigkeit häufig nicht aufgefangen wird und wieder aus dem Loch herausläuft („pump and dump“), wird sie bei Bohrungen an Land und auch bei einigen marinen Bohrungen wiederverwendet. Durch das Recycling der Bohrflüssigkeit reichern sich Mikroben und andere unerwünschte Substanzen in der Bohrspülung an und machen die Flüssigkeit damit noch ungeeigneter für die mikrobiologische Probennahme, als sie ohnehin schon ist. Reines Wasser ist aufgrund seiner geringen Dichte und Viskosität nur sehr eingeschränkt in der Lage, die ausgebohrten Gesteinsreste aus dem Bohrloch zu entfernen. Daher wird die Spülung häufig mit Tonmineralen oder Verdickungsmitteln versetzt und so die Dichte und Viskosität erhöht. Diese Zusätze vergrößern die Gefahr, dass weitere Mikroben in die Bohrspülung eingetragen werden. Ein weiteres großes Problem besteht darin, dass viele der eingesetzten Verdickungsmittel biologisch abbaubar sind. Auch wenn das vom Standpunkt des Umweltschutzes natürlich

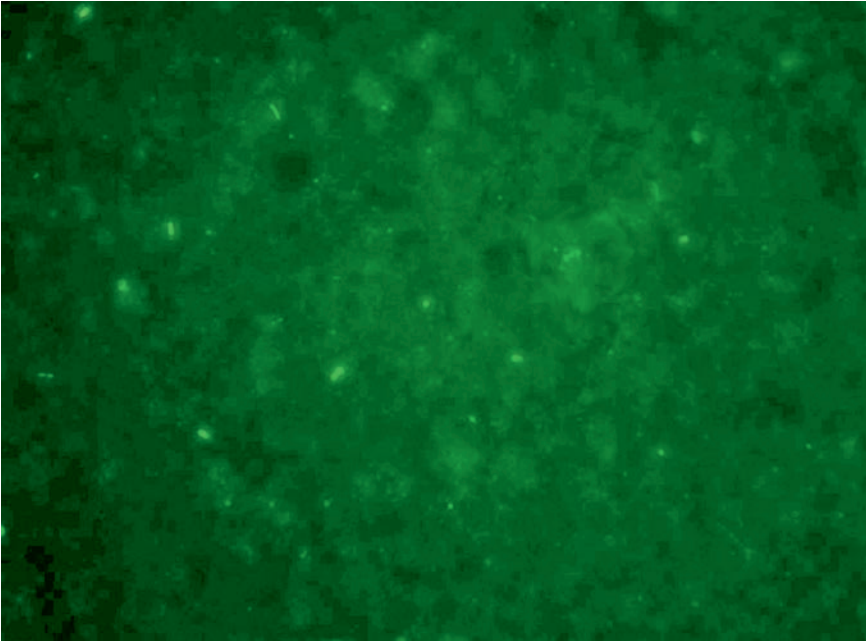


Abb. 2: Ein mikroskopisches Bild von Mikroben aus der tiefen Biosphäre. Die Zellen wurden mit einem DNA-Farbstoff angefärbt und sind als leuchtende, grüne Punkte zu erkennen. Die Mikroben haben einen Durchmesser von etwa $0,5 \mu\text{m}$. (Foto: J. Kallmeyer, GFZ)

Fig. 2: Microscopic picture of deep biosphere microbes. The cells were stained with a DNA-specific reagent and are now visible as small fluorescent green dots. The microbes have a diameter of ca. $0.5 \mu\text{m}$.

sehr positiv zu bewerten ist, bedeutet dieser Umstand allerdings auch, dass die Mikroben aktiv mit Nährstoffen gefüttert werden und sich dementsprechend gut vermehren.

Neben der Bohrspülung ist das Bohrgerät selbst eine Kontaminationsquelle. Die Menge an Ausrüstung für eine Bohrung ist immens. Allein die je nach Bohrung bis zu mehrere Kilometer langen Bohrstränge aus armdicken Stahlrohren wiegen viele Tonnen. Solche Massen an Ausrüstung können nicht sterilisiert werden. Außerdem werden große Mengen an Schmierstoffen verwendet, um die Gewinde am Bohrgestänge gängig zu halten. Diese normalerweise aus Erdöl gewonnenen Stoffe können sich in geringen Mengen in der Bohrspülung lösen. In einem solchermaßen kontaminierten Kern ist es nicht mehr möglich, die natürlich vorkommenden Kohlenwasserstoffe von denen des Gewindefetts zu unterscheiden. Um diesem Problem vorzubeugen, müssen die bis zu mehrere Kilometer Bohrgestänge vor der Benutzung aufwändig entfettet werden. Anstelle von Kohlenwasserstoff-basierten Schmierstoffen können auch synthetische Schmierstoffe eingesetzt werden, die aus nicht natürlich vorkommenden Komponenten bestehen. Bei der vom GFZ durchgeführten DEBITS (Deep Biosphere in Terrestrial Systems)-Bohrung in Neuseeland wurde beispielsweise ein Schmierfett aus synthetischem Biberöl benutzt.

Kontaminationskontrolle

Selbst mit größten Vorsichtsmaßnahmen gelangen Mikroben und unerwünschte Substanzen von der Oberfläche ins Bohrloch. Da sich die Kontamination nicht vermeiden lässt, muss ihre Ausbreitung verfolgt werden, um unkontaminierte Berei-

che zu identifizieren, aus denen geeignete Proben gewonnen werden können. Es geht also bei einer mikrobiologischen Bohrung in erster Linie um Kontaminationskontrolle und nicht um Kontaminationsvermeidung.

Alle Methoden der Kontaminationskontrolle beruhen darauf, dass eine Substanz der Bohrspülung zugesetzt wird (ein sogenannter „Tracer“), die nicht natürlich vorkommt, möglichst einfach auch in geringsten Konzentrationen mit hoher Genauigkeit quantifiziert werden kann und nach Möglichkeit nicht die geplanten Analysen beeinflusst.

Zur Kontaminationskontrolle werden kleine Proben aus dem Bohrkern entnommen, normalerweise je eine von der Außenkante und dem Zentrum des Kerns, sowie eine oder zwei Proben dazwischen. Aus diesen Proben wird anschließend der Tracer extrahiert und quantifiziert. Da die Konzentration des Tracers in der Spülung bekannt ist, kann berechnet werden, wie viel Bohrspülung in den Kern eingedrungen ist.

Zwei häufig eingesetzte Tracer sind Uranin (Na-Fluorescein) und Perfluorocarbon (Perfluoro-1,3-dimethylcyclohexan). Uranin ist ein sogenannter Farbstofftracer, er fluoresziert bei Anregung mit UV-Licht leuchtend grün. Diese Fluoreszenz lässt sich sehr empfindlich mit einem Fluorometer messen, wodurch sich auch sehr geringe Konzentrationen nachweisen lassen. Von allen Tracern ist Uranin mit Abstand der preiswerteste, doch leider lässt er sich nicht überall anwenden, da er auch bei Tageslicht leuchtend grün schimmert. Die Substanz ist zwar ungiftig, kann aber Seen und Flüssen eine neongrüne Färbung verleihen. Zudem reicht in einigen Fällen die Empfindlichkeit der Messung nicht aus, um extrem geringe Kontaminationen der Proben festzustellen. Die Empfindlichkeit beim Nachweis von Uranin



Abb. 3: Um zu vermeiden, dass die Organismen in den Bohrkernen durch Temperaturen geschädigt werden, die zu stark von der In-situ-Temperatur abweicht, muss die Beprobung der Bohrkerngebegebenenfalls im Kühlraum stattfinden. (Foto: J. Kallmeyer, GFZ)

Fig. 3: To avoid damaging deep biosphere organisms by temperatures that deviate too much from their in-situ temperature, it might be necessary to do all sampling inside a reefer.

reduziert sich deutlich, wenn die extrahierte Probe eine Eigenfärbung hat, z. B. durch einen hohen Anteil an Huminstoffen.

Perfluorocarbon-Tracer ist nicht wasserlöslich und muss daher permanent in dosierten Mengen durch die Ansaugöffnung der Bohrspülpumpe in die Bohrung eingebracht werden. Aus einem frisch gebohrten Kern werden die Proben zügig für die Kontaminationskontrolle entnommen und in gasdichte Glasgefäße mit etwas Wasser überführt. Nach einer kurzen Erwärmung tritt der Perfluorocarbon-Tracer aus dem Wasser aus und befindet sich in der Gasphase, in der er über Gaschromatographie analysiert werden kann. Dieses Verfahren ist wesentlich empfindlicher, benötigt aber einen Gaschromatographen vor Ort – ein deutlicher Nachteil gegenüber der Farbstoffmessung, die mit einem handlichen Fluorometer durchgeführt werden kann.

Eine andere Form von Tracer sind die sogenannten Partikeltracer, auch bekannt als Microspheres oder Microbeads. Dabei handelt es sich um fluoreszierende Kunststoffpartikel mit einer Größe im Bereich von $0,5\ \mu\text{m}$, also etwa der typischen Größe einer Mikrobienzelle in der tiefen Biosphäre (Abb. 2).

Diese Partikel können über Zentrifugation in gesättigter Kochsalzlösung aus der Sedimentprobe extrahiert und auf einen Filter überführt werden, auf dem man sie unter einem Fluoreszenzmikroskop auszählt. Leider sind diese Partikel sehr teuer, so dass sie sich nicht für tiefe Bohrungen mit großen Mengen an Bohrflüssigkeit eignen.

Wie tief die Bohrspülung in einen Kern eindringt, hängt von verschiedenen Faktoren ab. Der Wichtigste ist die Porosität des zu bohrenden Sediments oder Gesteins. Je poröser und durchlässiger das Material ist, umso schneller und tiefer dringt die Bohrspülung ein und macht die Proben unter Umständen unbrauchbar für die Mikrobiologie. Ein weiterer Faktor ist der Flüssigkeitsdruck am Bohrkopf: bei einem zu hohen Druck wird die Spülung in das Gestein vor dem Bohrer hineingepresst. Trotz all dieser widrigen Umstände lassen sich selbst in größten Tiefen noch unkontaminierte Proben gewinnen.

Geomikrobiologie mit hohem Anspruch

Wie bereits beschrieben, ist eine Tiefbohrung eine – geobiologisch gesehen – recht schmutzige Angelegenheit, bei der große und schwere Maschinen eingesetzt werden müssen. Das steht offensichtlich in einem starken Gegensatz zur mikrobiologischen Forschung, bei der mit kleinsten Lebewesen unter extrem sauberen Bedingungen gearbeitet wird. Der Anspruch an eine aus geomikrobiologischer Sicht erfolgreiche Bohrkampagne ist daher sehr hoch. In den letzten Jahren hat sich mit zunehmender Erfahrung deutlich gezeigt, dass sich der Mehraufwand bei einer frühzeitigen Einbindung der Geomikrobiologie in die Planung der Bohrung auf ein Minimum reduzieren lässt. Die Gewinnung unkontaminierter Proben ist auch für geochemische Analysen von großer Bedeutung.

Ausblick

Die Erforschung der tiefen Biosphäre ist ohne Bohrungen nicht möglich. Auch wenn sich in den letzten Jahren die Anzahl der wissenschaftlichen Bohrprojekte mit einer geomikrobiologischen Komponente deutlich erhöht haben, ist das Wissen noch immer fragmentarisch. Ein wichtiges Ziel der beiden großen wissenschaftlichen Bohrprogramme (ICDP, IODP) wird die Einführung von standardisierten Probennahmen bei allen zukünftigen Bohrungen sein. Auch wenn dabei nur wenige Parameter gemessen werden, wird sich die Datenbasis signifikant vergrößern und ein genaueres Bild der Lebensräume im tiefen Untergrund liefern. Auch regionale Unterschiede der tiefen Biosphäre und damit der Stoffkreisläufe können so erfasst werden – eine wichtige Grundlage für die Nutzung des Untergrunds und die Bewertung des globalen Wandels.

Literatur

- Bischoff, J., Mangelsdorf, K., Gattinger, A., Schloter, M., Kurchatova, A. N., Herzsich, U., Wagner, D. (2013): Response of methanogenic archaea to late pleistocene and holocene climate changes in the siberian arctic. - *Global Biogeochemical Cycles*, 27, 2, 305-317. DOI: <http://doi.org/10.1029/2011GB004238>
- Fry, J. C., Horsfield, B., Sykes, R., Cragg, B. A., Heywood, C., Tae Kim, G., Mangelsdorf, K., Mildenhall, D. C., Rinna, J., Vieth-Hillebrand [Vieth], A., Zink, K.-G., Sass, H., Weightman, A. J., Parkes, R. J. (2009): Prokaryotic populations and activities in an interbedded coal deposit, including a previously deeply buried section (1.6-2.3 km) above 150 Ma basement rock. - *Geomicrobiology Journal*, 26, 3, 163-178. DOI: <http://doi.org/10.1080/01490450902724832>
- Glombitza, C., Stockhecke, M., Schubert, C. J., Vetter, A., Kallmeyer, J. (2013): Sulfate reduction controlled by organic matter availability in deep sediment cores from the saline, alkaline Lake Van (Eastern Anatolia, Turkey). - *Frontiers in Microbiology*, 4, 209. DOI: <http://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00209>
- Horsfield, B., Schenk, H. J., Zink, K.-G., Ondrak, R., Dieckmann, V., Kallmeyer, J., Mangelsdorf, K., di Primio, R., Wilkes, H., Parkes, R. J., Fry, J., Cragg, B. (2006): Living microbial ecosystems within the active zone of catagenesis: implications for feeding the deep biosphere. - *Earth and Planetary Science Letters*, 246, 1-2, 55-69. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.epsl.2006.03.040>
- Lippmann, J., Stute, M., Torgersen, T., Moser, D., Hall, J., Lihung, L., Borcik, M., Bellamy, R. E. S., Onstott, T. C. (2003): Dating ultra-deep mine waters with noble gases and ³⁶Cl, Witwatersrand Basin, South Africa. - *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 67, 23, 4597-4619. DOI: [http://doi.org/10.1016/S0016-7037\(03\)00414-9](http://doi.org/10.1016/S0016-7037(03)00414-9)
- Mangelsdorf, K., Haberer, R. M., Zink, K.-G., Dieckmann, V., Wilkes, H., Horsfield, B. (2005): Molecular indicators for the occurrence of deep microbial communities at the JAPEX/JNOC/GSC et al. Mallik 5L-38 gas hydrate production research well - In: Dallimore, S. R., Collett, T. S. (Eds.), *Scientific Results from Mallik 2002 Gas Hydrate Production Research Well Program, Mackenzie Delta, Northwest Territories, Canada*, (GSC Bulletin; 585), Geological Survey of Canada, 1-11.
- Mangelsdorf, K., Zink, K.-G., di Primio, R., Horsfield, B. (2011): Microbial lipid markers within and adjacent to Challenger Mound in the Belgica carbonate mound province, Porcupine Basin, offshore Ireland (IODP Expedition 307). - *Marine Geology*, 282, 1-2, 91-101. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.margeo.2010.05.007>
- Wandrey, M., Morozova, D., Zettlitzer, M., Würdemann, H., CO₂SINK Group (2010): Assessing drilling mud and technical fluid contamination in rock core and brine samples intended for microbiological monitoring at the CO₂ storage site in Ketzin using fluorescent dye tracers. - *International Journal of Greenhouse Gas Control*, 4, 6, 972-980. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.ijggc.2010.05.012>