

Helmholtz-Zentrum Potsdam, Deutsches GeoForschungsZentrum GFZ,  
Mikrobielles GeoEngineering,

**Mikroorganismen in geothermischen Aquiferen - Einfluss  
mikrobieller Prozesse auf den Anlagenbetrieb**

Kumulative Dissertation zur Erlangung des  
naturwissenschaftlichen Doktorgrades

- Dr. rer. nat. -

eingereicht an der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Universität Potsdam

von Stephanie Lerm

Potsdam, den 02.07.2012

1. Gutachter: Prof. Dr. Schneider, Universität Potsdam
  2. Gutachter: Dr.-Ing. Würdemann, GFZ Potsdam
- Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 19.11.2012

Online veröffentlicht auf dem  
Publikationsserver der Universität Potsdam:  
URL <http://opus.kobv.de/ubp/volltexte/2013/6370/>  
URN [urn:nbn:de:kobv:517-opus-63705](http://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:kobv:517-opus-63705)  
<http://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:kobv:517-opus-63705>

# Inhalt

<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>I</b>
<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1. Geothermie und deren technische Nutzung.....	1
1.2. Mikroorganismen in geothermisch genutzten Aquiferen.....	3
1.2.1. Bildung und Auswirkung von Biofilmen.....	3
1.2.2. Mikrobielle Stoffwechselprozesse.....	4
1.3. Anpassungen von Mikroorganismen an die teils extremen Bedingungen in Aquiferen.....	7
1.4. Molekularbiologische Methoden zur Analyse mikrobieller Gemeinschaften.....	9
1.5. Störungen im Betrieb geothermischer Anlagen.....	11
1.5.1. Biofouling und Scaling: Schädigungen durch Biofilme und mineralische Ablagerungen....	12
1.5.2. Korrosion: Schädigung metallischer Werkstoffe.....	13
<b>2. Zielsetzung der Arbeit</b> .....	<b>15</b>
<b>3. Ergebnisse</b> .....	<b>16</b>
3.1. Mikrobiologisches Monitoring in zwei geothermisch genutzten Aquiferen Norddeutschlands ..	18
3.1.1. Summary.....	19
3.1.2. Zusammenfassung.....	20
3.1.3. Einleitung.....	21
3.1.4. Material und Methoden.....	24
3.1.5. Ergebnisse und Diskussion.....	29
3.1.6. Zusammenfassende Bewertung.....	38
3.2. Influence of microbial processes on the operation of a cold store in a shallow aquifer: impact on well injectivity and filter lifetime.....	41
3.2.1. Abstract.....	42
3.2.2. Kurzfassung.....	42
3.2.3. Introduction.....	43
3.2.4. Material and Methods.....	45
3.2.5. Results and Discussion.....	52
3.2.6. Conclusion.....	61

3.3.	Thermal effects on microbial composition and microbiologically induced corrosion and mineral precipitation affecting operation of a geothermal plant in a deep saline aquifer .....	63
3.3.1.	Abstract .....	64
3.3.2.	Introduction .....	64
3.3.3.	Materials and methods.....	67
3.3.4.	Results .....	73
3.3.5.	Discussion .....	81
3.3.6.	Conclusions .....	88
<b>4.</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>89</b>
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>99</b>
<b>6.</b>	<b>Ausblick.....</b>	<b>102</b>
<b>7.</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>104</b>
<b>8.</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>105</b>

## Abkürzungsverzeichnis

ATES	aquifer thermal energy storage
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DGGE	denaturing gradient gel electrophoresis
DNA	deoxyribonucleic acid
DOC	dissolved organic carbon
EPS	extrapolymere Substanz
FISH	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung
PCR	polymerase chain reaction
RNA	ribonucleic acid
rRNA	ribosomal RNA
SHE	Standard-Wasserstoffelektrode
SRB	sulfatreduzierende Bakterien
SSCP	single-strand conformation polymorphism
TDS	total dissolved solids
TOC	total organic carbon



## 1. Einleitung

### 1.1. Geothermie und deren technische Nutzung

Erdwärme gehört zu den grundlastfähigen, alternativen Energiequellen, die im Zuge der Energiewende in den kommenden Jahren ausgebaut werden sollen, um die bisherigen konventionellen fossilen Energieträger Kohle und Erdgas zu ersetzen.

In der Geothermie werden Aquifere, als natürlich vorkommende Grundwasserschichten, die nach oben und unten hydraulisch abgeschlossen sein können und aus wasserdurchlässigem Gestein oder unverfestigtem Kies, Sand oder Schlamm bestehen, technisch genutzt. Deutschlands wichtigste Regionen in Hinblick auf geothermische Nutzungen sind das Norddeutsche Becken, der Oberrheingraben und das Molassebecken.

Neben der Förderung von heißem Fluid aus einer ausreichend produktiven Gesteinsschicht zur Stromerzeugung und direkten Wärmenutzung, können Aquifere auch für die Speicherung saisonal im Überschuss anfallender Wärme und Kälte genutzt werden (ATES Aquifer Thermal Energy Storage) (Sanner 2001). ATES-Systeme werden weltweit seit mehr als 45 Jahren erfolgreich zur Klimatisierung, d.h. dem Beheizen und Kühlen von Gebäuden eingesetzt (Morosfky 1994, Allen et al. 2000, Paksoy et al. 2000, Schmidt et al. 2003). Die Energiespeicherung in Aquiferen findet v.a. im Norddeutschen Becken in mesozoischen Sandsteinen und pleistozänen Sanden Anwendung (Feldrappe et al. 2007). So kann zum Einen dem aus einem Aquifer geförderten Fluid im Winter über einen Wärmetauscher Wärme entzogen und das Fluid anschließend wieder in den Aquifer injiziert werden. Der Aquifer dient dann als ein sogenannter „Kältespeicher“ und das gespeicherte kalte Fluid wird im Sommer zur Kühlung von Gebäuden genutzt (Kabus & Seibt 2000). Zum Anderen wird bei einem „Wärmespeicher“ die Abwärme aus Kraft-Wärme-Kopplungsanlagen, Solaranlagen oder aus Gas- und Kohle-Kraftwerken durch Wärmeübertragung auf das Formationsfluid in Aquiferen gespeichert, so dass dann damit im Winter Gebäude beheizt werden können (Kabus & Bartels 2004, Schmidt et al. 2004).

Bei einer geothermischen Anlage ist der Aquifer über mindestens 2 Bohrungen, die sich in einem bestimmten Abstand zueinander befinden, als Dublette erschlossen (Abb. 1). Dabei dient eine Bohrung zur Produktion und die andere zur Injektion des Formationsfluids. Bei einem Kälte- oder Wärmespeicher sind beide Bohrungen mit Pumpen ausgestattet und die Bohrungen dienen im Wechsel als Produktions- und Injektionsbohrung. Darüber hinaus ist auch eine Kombination von mehreren Produktions- und Injektionsbohrungen möglich. Der Kreislauf des Formationsfluids wird obertägig durch ein Kraftwerk geschlossen, in dem sich u.a. Wärmetauscher und

# Einleitung

Filtersysteme befinden, und mündet im Untergrund in ein offenes System. Die Bohrungen geothermischer Anlagen werden mit Stickstoff beaufschlagt, wodurch der Zutritt von Sauerstoff in die Anlage und die Bildung von Ausfällungen durch Druckentlastung im produzierten Fluid vermieden werden soll. In geothermischen Anlagen herrschen durch die Stickstoffbeaufschlagung anoxische Bedingungen.

Bei ATES-Anlagen bilden sich im Aquifer auf Grund der Speicherung und Entnahme von Wärme um beide Bohrungen Bereiche aus, in denen die Temperatur des Formationsfluid über bzw. unter der ursprünglichen Aquifertemperatur liegt. Die Ausdehnung der kalten und warmen Bereiche im Gestein hängt von den Eigenschaften des Aquifers und der Intensität der geothermischen Nutzung ab.

Zu den in Deutschland bedeutenden Standorten an denen ATES betrieben wird, zählen Rostock-Brinkmannshöhe (Wohngebiet mit gekoppelter Solaranlage, siehe Kapitel 3.1.), der Reichstag in Berlin (Anlage zur Klimatisierung der Parlamentsbauten, siehe Kapitel 3.2.) und Neubrandenburg (Anlage zur Beheizung eines Wohngebietes, siehe Kapitel 3.3.). Neben diesen drei Anlagen wurde im Rahmen dieser Arbeit eine weitere geothermische Anlage im Norddeutschen Becken, die Anlage in Neuruppin (Anlage für balneologische Zwecke) untersucht. Die Fluide dieser geothermisch genutzten Aquifere weisen in Abhängigkeit von der Tiefe und dem Speichergestein Temperaturen zwischen 5°C und 90°C und Salinitäten von <math><1 \text{ mg l}^{-1}</math> bis zu <math>>200 \text{ g l}^{-1}</math> auf.

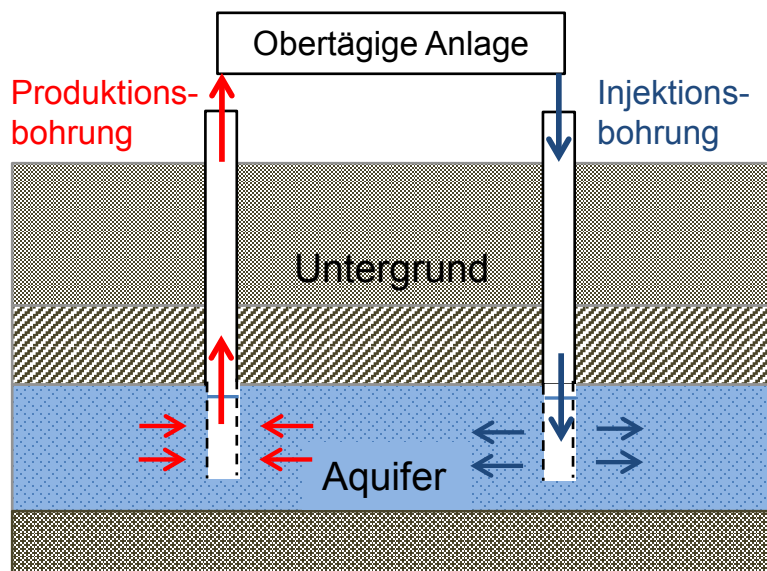


Abb. 1. Schematische Darstellung einer tiefen geothermischen Dublette.



## **1.2. Mikroorganismen in geothermisch genutzten Aquiferen**

Bis in die 80-iger Jahre des 20. Jahrhunderts wurde vermutet, dass Mikroorganismen und deren katalysierte Prozesse in tiefen Gesteinsschichten eine eher unbedeutende Rolle spielen (Alexander 1977). Als tiefe terrestrische Sedimente werden die Schichten im Untergrund definiert, die tiefer als 30 m - 35 m liegen (Balkwill et al. 1989). Zwar wurde in einzelnen Studien die Präsenz von Mikroorganismen in der „Tiefen Biosphäre“ angedeutet (Buswell & Larson 1937, ZoBell 1947, Dockins et al. 1980), aber erst durch die Entwicklung und Nutzung aseptischer Probenahmetechniken konnte belegt werden, dass Aquifere und tiefe Sedimente durch vielfältige mikrobielle Gemeinschaften besiedelt sind.

### **1.2.1. Bildung und Auswirkung von Biofilmen**

In der tiefen Biosphäre, wie auch in anderen aquatischen Habitaten, kommen Mikroorganismen meist in Aggregaten vor und bilden an der Grenzfläche zwischen Gestein und Wasser Biofilme und mikrobielle Matten (Teske & Stahl 2002). Die Struktur und Mächtigkeit von Biofilmen wird dabei durch die Fließgeschwindigkeit, das Nährstoffangebot, den pH-Wert und die Redoxverhältnisse beeinflusst (Flemming 1994). Die Bildung eines Biofilms beginnt mit einem schleimigen Überzug und entwickelt sich dann zu einer komplexen Struktur aus stoffwechselphysiologisch unterschiedlichen Mikroorganismen, die in einer Matrix aus mikrobiell gebildeter extrapolymerer Substanz (EPS), aus Polysacchariden, Proteinen, Nukleinsäuren, Lipiden und Huminstoffen eingebettet sind (Nielsen et al. 1997, Wingender et al. 1999). Die Bildung eines an Oberflächen assoziierten Biofilms bringt für die Mikroorganismen eine Reihe von Vorteilen. So wird durch EPS einerseits gelöster organischer Kohlenstoff, Metalle, Kationen und Toxine gebunden, findet durch hoch permeable Wasserkanäle im Inneren des Biofilms ein effektiver Austausch an Nährstoffen und Metaboliten statt und die Mikroorganismen sind in einem gewissen Maße vor Umweltstress, wie extremen pH- und Temperaturänderungen geschützt (Davey & O'Toole 2000, Flemming 2008). Zudem werden durch die Kompaktheit des Biofilms und dem engen Zusammenleben stoffwechselphysiologisch unterschiedlicher Mikroorganismen syntrophe Prozesse begünstigt. Biofilme können in den mit mineralisiertem Wasser gefüllten Gesteinssporen, Spalten und Rissen eines Aquifers vorkommen. Die dort lebenden Mikroorganismen müssen mit einem reduzierten Angebot an Nährstoffen zurechtkommen, da Aquifere meist durch undurchlässige Deckschichten gegenüber aufliegenden Gesteinsschichten abgegrenzt sind („confined aquifer“). Dadurch wird der Zustrom von Wasser und Nährstoffen von der Oberfläche verhindert und es kommt zu einem nur sehr langsamen Austausch mit dem

# Einleitung

---

umliegenden Gestein (Pedersen 2000, Griebler & Lueders 2009). Anpassungsstrategien, wie erhöhte Affinität zu den Nährstoffen, reduzierte Stoffwechselraten und verlangsamtes Wachstum tragen in diesem Zusammenhang dazu bei, dass Mikroorganismen in diesen Habitaten überleben (Teixeira de Mattos & Neijssel 1997, Brune et al. 2000). Zu den in Aquiferen nachgewiesenen Organismen gehören sowohl Prokaryoten (*Bacteria*, *Archaea*) als auch Eukaryoten (Protozoa, Pilze, Hefen), wobei die Verbreitung von Eukaryoten auf oberflächennahe Aquifere begrenzt zu sein scheint (Griebler & Lueders 2009). Basierend auf der Sequenzierung prokaryotischer 16S rRNA Gene dominieren in tiefen terrestrischen Sedimenten vermutlich *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Firmicutes*, *Chloroflexi*, Vertreter der *Geobacteraceae*, Sulfatreduzierer, Denitrifizierer, Fermentierer und acetogene Mikroorganismen (Boivin-Jahns et al. 1996, Chandler et al. 1997, Detmers et al. 2001, 2004, Inagaki et al. 2005, Kovacik et al. 2006). Bei den *Archaea* sind es die *Crenarchaeota*, *Methanosarcinales* und *Methanobacteriales* (Takai et al. 2003).

Die anthropogene Nutzung von Aquiferen und die Injektion von erwärmten Fluid verändert den Untergrund und führt beispielsweise zu Karbonatausfällungen (Griffioen & Appelo 1993), der verstärkten Lösung von Silikaten (Arning et al. 2006) und der Mobilisierung von organischem Material (Brons et al. 1991, Kalbitz et al. 2000, Burdige 2007, Rothman & Forney 2007, Boudreau et al. 2008, Hubert et al. 2010). Im Gegenzug beeinflusst auch eine Absenkung der Fluidtemperatur im Aquifer die mikrobielle Gemeinschaft. Untersuchungen von Brielmann et al. (2011) zeigten, dass insbesondere die Diversität und Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaft in einem Aquifer sehr temperatursensitiv ist.

## 1.2.2. Mikrobielle Stoffwechselprozesse

Die in Aquiferen stattfindenden mikrobiellen Stoffwechselprozesse sind entsprechend den unterschiedlichen geologischen, hydrologischen und geochemischen Heterogenitäten äußerst divers und stellen einen fundamentalen Bestandteil des globalen Nährstoff- und Energiekreislaufs dar (Trudinger & Swaine 1979, Fredrickson et al. 1989, Bachofen et al. 1998, Gadd 2000, Griebler & Lueders 2009). Mikrobielle Stoffwechselprozesse sind von den in Gesteinsschichten vorhandenen Energie- und Kohlenstoffquellen sowie Elektronenakzeptoren abhängig. Dabei kann zwischen heterotrophen und autotrophen Prozessen unterschieden werden.

Bei dem auf organischem Kohlenstoff basierenden heterotrophen Stoffwechsel wird das an das Gestein gebundene organische Material (Hedges & Keil 1995) oder der über Zuflüsse in den Aquifer gelangte Kohlenstoff verbraucht. Der Gehalt an gelöstem organischen Kohlenstoff (dissolved organic carbon, DOC) nimmt im Untergrund mit steigender Tiefe ab, da er in den

## Einleitung

---

oberen Gesteinsschichten meist schon durch mikrobielle Abbauprozesse umgesetzt wurde oder in Form von Huminstoffen vorliegt und somit nur schwer abbaubar ist.

Die Bedeutung des chemolithoautotrophen Stoffwechsels wurde für zahlreiche tiefe Aquifere (Stevens 1997, Pedersen 2001, Amend & Teske 2005) nachgewiesen. So zeigte sich, dass durch ihn heterotrophe Organismen kontinuierlich mit organischem Kohlenstoff versorgt werden. Chemolithotrophe Mikroorganismen nutzen Wasserstoff ( $H_2$ ) als Energiequelle und sind bei den Nitrat-, Mangan-, Eisen- und Sulfatreduzierern zu finden. Wasserstoff kann im Untergrund durch den thermischen Abbau organischer Substanz, über mikrobielle Fermentation und durch metamorphe Prozesse an Tiefengestein in Subduktionszonen gebildet werden (Dong & Yu 2007). Anaerobe chemolithoautotrophe Mikroorganismen nutzen zudem durch radiolytische Zersetzung von Wasser aus Subduktionszonen austretenden Wasserstoff ( $H_2$ ) und Kohlendioxid ( $CO_2$ ) als Energie- und Kohlenstoffquelle (Pedersen 2000, Fredrickson & Balkwill 2006, Lin et al. 2006). Neben dem Calvin-Benson-Bassham Zyklus (Calvin Zyklus) sind derzeit drei alternative Stoffwechselwege zur  $CO_2$ -Fixierung bekannt: der reduktive Tricarbonsäure (TCA) -Zyklus, der reduktive Acetyl-CoA-Weg und der 3-Hydroxypropionat-Zyklus (Atomi 2002, Madigan et al. 2003). Zudem können primäre Schwefelverbindungen wie Pyrit ( $FeS_2$ ) und Mackinawit ( $FeS$ ) (Scheffer & Schachtschabel 2002) sowie amorphe sulfidische Sekundärbildungen chemolithoautotrophen denitrifizierenden Mikroorganismen als Energiequelle dienen (Böttcher 1992).

Zu den von Mikroorganismen in Aquiferen genutzten Elektronenakzeptoren gehören Nitrat ( $NO_3^-$ ), Mangan ( $Mn^{4+}$ ), Eisen ( $Fe^{3+}$ ), Sulfat ( $SO_4^{2-}$ ), elementarer Schwefel ( $S^0$ ) und Kohlendioxid ( $CO_2$ ). In einem Aquiferabschnitt können zwei oder mehr Elektronenakzeptoren verbrauchende Prozesse parallel stattfinden (Bekins et al. 1999, Jakobsen & Postma 1999, Cozzarelli et al. 2000). Dabei findet der Prozess mit dem geringeren Redoxpotential in dem kleineren Porenraum und der stärker reduzierten Umgebung statt (Kleikemper 2003). Sauerstoff ( $O_2$ ) spielt in Aquiferen als Elektronenakzeptor meist keine Rolle, da er überwiegend schon in den oberflächennahen Schichten durch aerobe, heterotrophe Organismen verbraucht wurde und nicht durch Photosynthese neu produziert werden kann.

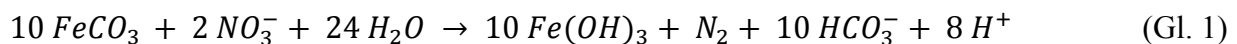
Eisen liegt in Abhängigkeit vom pH-Wert und Redoxpotential als lösliches  $Fe^{2+}$  oder unlösliches  $Fe^{3+}$  vor und kann durch abiotische und biotische Prozesse in den jeweils anderen Oxidationszustand umgewandelt werden (Stumm & Sulzberger 1992). Mikroorganismen, wie *Geobacter* sp. und *Shewanella* sp. koppeln die Reduktion von Eisen ( $Fe^{3+}$ ) an die Oxidation von Wasserstoff oder organischen Kohlenstoff (Lovley & Phillips 1986, Nealson & Saffarini 1994, Lovley et al. 1998, Roden 2006, Crosby et al. 2007) und führen zur Bildung von Siderit ( $FeCO_3$ ),

## Einleitung

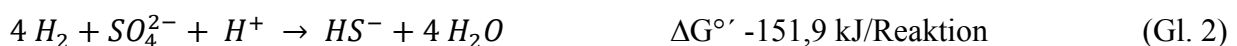
---

Magnetit ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ), Vivianit ( $\text{Fe}_2(\text{PO}_4)_2 \cdot 8 \text{H}_2\text{O}$ ) und grünem Rost ( $\text{Fe}^{\text{II}}_4\text{Fe}^{\text{III}}_2(\text{OH})_{12}\text{SO}_4 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ ) (Fredrickson et al. 1998, Cooper et al. 2000, Zachara et al. 2002).

Die abiotische Eisenoxidation findet beim Kontakt anoxischen Grundwassers mit Sauerstoff oder durch das Einmischen sauerstoffhaltigen Grundwassers statt und führt zur Bildung von Hydroxiden. Ebenso ruft die in aeroben und anaeroben Habitaten stattfindende mikrobielle Oxidation von Eisenverbindungen (Straub et al. 1996, Emerson et al. 2010, Hedrich 2011) die Bildung von Hydroxiden ( $\text{Fe}(\text{OH})_3$ ), Oxyhydroxiden ( $\text{FeO}(\text{OH})$ ) oder Oxiden ( $\text{Fe}_2\text{O}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) hervor. Bei den eisenoxidierenden Bakterien kann zwischen vier physiologischen Gruppen unterschieden werden: (1) säuretolerante, aerobe Eisenoxidierer, (2) neutrophile, aerobe Eisenoxidierer, (3) neutrophile, anaerobe (nitratabhängige) Eisenoxidierer und (4) anaerobe photosynthetische Eisenoxidierer. Alle vier Gruppen der Eisenoxidierer werden den *Proteobacteria* zugeordnet (Hedrich et al. 2011). Die nitratabhängige Eisenoxidation ist in Gleichung 1 dargestellt (Straub et al. 1996).



Die Reduktion oxidierter Schwefelverbindungen wie Sulfat findet in anoxischen marinen und terrestrischen Habitaten durch sulfatreduzierende Bakterien (SRB) statt und führt zur Bildung von Sulfid und anderen reduzierten Schwefelverbindungen (Baas Becking & Moore 1961, Birkeland 2005, Muyzer & Stams 2008, Barton & Fauque 2009). Dieser Prozess ist an die Oxidation von Wasserstoff und organischen Kohlenstoff gekoppelt. In den Gleichungen 2 und 3 ist die Oxidation von Wasserstoff bzw. Acetat durch SRB dargestellt (Postgate 1984, Barton & Tomei 1995, Rabus et al. 2000).

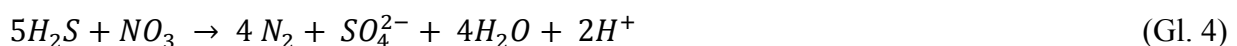


Phylogenetisch können die SRB in vier unterschiedliche Gruppen eingeteilt werden: (1) gram-negative SRB aus der Klasse der *Deltaproteobacteria*, mit mehr als 25 Gattungen (z.B. *Desulfobulbus*, *Desulfovibrio*), (2) gram-positive sporenbildende SRB aus der Klasse der *Clostridia* (*Desulfotomaculum*, *Desulfosporosinus*), (3) thermophile bakterielle SRB (*Thermodesulfobacterium*, *Thermodesulfovibrio*) und (4) thermophile archaeale SRB (*Archaeoglobus*) (Rabus et al. 2006). Die bei der Sulfatreduktion entstehenden Sulfide können wiederum im gleichen Aquifer durch chemolithotrophe denitrifizierende Schwefeloxidierer, wie

# Einleitung

---

*Thiobacillus denitrificans*, *Sulfurimonas denitrificans* (früher *Thiomicrospira denitrificans*, Takai et al. 2006), *Sulfuricurvum kujiense* und *Thiothrix* umgewandelt werden (Friedrich et al. 2005, Cardoso et al. 2006, Ghosh & Dam 2009) (siehe Gl. 4). Schwefeloxiderende Bakterien wie *Thiothrix* sind daher in den Übergängen zwischen anoxischen, sulfidreichen und aeroben Zonen im Wasser und in Sedimenten zu finden. Reduzierte Schwefelverbindungen (Sulfid, Thiosulfat,  $S^0$ , Polysulfide) können auch von anaeroben phototrophen Mikroorganismen, wie Purpurschwefelbakterien (*Chromatiaceae*), Purpur Nichtschwefelbakterien (*Rhodospirillaceae*), *Ectothiorhodospiraceae*, Grüne Schwefelbakterien (*Chlorobiaceae*), filamentöse Anoxyphotobakterien (*Chloroflexaceae*) und *Heliobacteria* (Kondratieva et al. 1999, Overmann & Garcia-Pichel 2000, Imhoff et al. 2005) als Elektronendonatoren für die photosynthetische  $CO_2$ -Reduktion genutzt werden.



### 1.3. Anpassungen von Mikroorganismen an die teils extremen Bedingungen in Aquiferen

Zelluläre und physiologische Anpassungsmechanismen ermöglichen es Mikroorganismen in Aquiferen zu leben, in denen teils physiko-chemische Extreme herrschen. Darüber hinaus können einige Mikroorganismen in einen Ruhezustand gehen, indem sie Sporen, Cysten oder andere Formen von Überdauerungszellen bilden. Zeitliche Phasen in denen ein Mangel an Nährstoffen herrscht, sowie hohe Temperaturen und Strahlung können so von Mikroorganismen überstanden werden (Burke & Wiley 1937, Amy 1997, Suzina et al. 2004, Johnson et al. 2007).

Die für Mikroorganismen in geothermisch genutzten Aquiferen wichtigsten Umweltfaktoren sowie die entsprechenden zellulären und physiologischen Anpassungen werden im nachfolgenden Abschnitt kurz erläutert.

#### Temperatur

Der Temperaturbereich, in dem mikrobielle Aktivität und Reproduktion möglich ist, wird derzeit mit  $-20^\circ\text{C}$  bis  $+122^\circ\text{C}$  angegeben (Kashefi & Lovley 2003, Price & Sowers 2004, Takai et al. 2008). Die obere Temperaturgrenze wird dabei durch zwei aus einer heißen Quelle isolierten Organismen, dem Archaeon *Strain 121* und *Methanopyrus kandleri* besetzt (Kashefi & Lovley 2003, Takai et al. 2008). Entsprechend ihrem Toleranzbereich werden Mikroorganismen in (a)

## Einleitung

---

psychrophil ( $T_{\text{Wachstum}} \leq 0^{\circ}\text{C} - 20^{\circ}\text{C}$ ), (b) mesophil ( $T_{\text{Wachstum}} 30^{\circ}\text{C} - 40^{\circ}\text{C}$ ), (c) thermophil ( $T_{\text{Wachstum}} 60^{\circ}\text{C} - 80^{\circ}\text{C}$ ) und (d) hyper-thermophil ( $T_{\text{Wachstum}} > 80^{\circ}\text{C}$ ) unterteilt. Für ATES genutzte geothermische Aquifere decken alle Temperaturbereiche für mikrobielles Leben ab.

Im Vergleich zu mesophilen Mikroorganismen sind bei psychrophilen und thermophilen Organismen Unterschiede auf zellulärer Ebene, bei den Proteinen, der DNA und dem Aufbau der Zellmembran nachweisbar. So besitzen psychrophile Organismen nicht nur einen hohen Anteil an ungesättigten Fettsäuren um die Fluidität der Zellmembran zu erhöhen (Nichols et al. 2004, Feller & Gerday 2003), sondern auch deren Enzyme besitzen oft eine höhere Flexibilität, die das Wechselwirken mit Substraten verbessert und eine geringere notwendige Aktivierungsenergie zur Folge hat. Eine erhöhte Enzymflexibilität wird durch weniger Wasserstoffbrückenbindungen und Salzbrücken, einem weniger kompakten hydrophoben Kern, mehr hydrophoben dem Lösungsmittel zugewendeten Seitenketten und längeren und stärker hydrophilen Schleifen erreicht. Zudem ist der Gehalt an Prolin- und Argininresten geringer und der Anteil an Glycinresten erhöht (Russell 2000, Smalå et al. 2000, Gianese et al. 2002, Georlette et al. 2004).

Bei thermophilen Mikroorganismen werden Proteine dadurch hitzestabil, indem neben vorhandenen Salzbrücken die Molekülgröße durch das Fehlen von Schleifen auf der Oberfläche reduziert wird und der Anteil an geladenen und hydrophoben Reste mit verzweigten Seitenketten erhöht ist (Kumar & Nussinow 2001). Die DNA thermophiler Mikroorganismen ist durch DNA-Bindemoleküle, einen erhöhten GC-Gehalt und durch die „supercoiled“ Form (spiralisierte Helices) stabilisiert. Auch die Fluidität der Zellmembranen ist gegenüber mesophilen Organismen durch einen höheren Anteil an gesättigten, verzweigten Fettsäuren herabgesetzt (Aerts et al. 1985).

### **Salinität**

Mikroorganismen, die bei erhöhten Salzkonzentrationen leben, werden als halotolerant und halophil bezeichnet. Entsprechend ihres Toleranzbereiches wird zwischen schwach ( $\text{NaCl } 20 - 50 \text{ g l}^{-1}$ ), moderat ( $\text{NaCl } 50 - 200 \text{ g l}^{-1}$ ) und extrem halophilen ( $\text{NaCl } 200 - 300 \text{ g l}^{-1}$ ) unterschieden (Kushner 1978, Larsen 1986). Halophile Organismen speichern eine Vielzahl niedermolekularer organischer Verbindungen wie Prolin, Glycin, Betain, Amine und deren Derivate, aber auch Kohlenhydrate, neutrale Peptide und Aminosäuren in ihrem Zytoplasma, um dem von außen wirkenden osmotischen Stress entgegen zu wirken (Kempf & Bremer 1998, Roberts 2005).

## **Druck**

Aufgrund der schwierigen Kultivierung von barophilen Mikroorganismen unter *in situ* Bedingungen im Labor, fehlen bisher umfassende biochemische Untersuchungen zu diesen Organismen. Jedoch finden derzeit entsprechende Experimente statt und belegen z.B. einen Zusammenhang zwischen Druck und Genexpression sowie einem erhöhten Anteil an ungesättigten Fettsäuren in Membranen zur Erhöhung der Fluidität (Nakasone et al. 1998, Aertsen 2009).

## **1.4. Molekularbiologische Methoden zur Analyse mikrobieller Gemeinschaften**

Die Kenntnisse über die Biodiversität in unterirdischen Habitaten sind bis dato auch deswegen unzureichend, da bis zu 99 % der in entsprechenden Habitaten vorkommenden Mikroorganismen bisher nicht bzw. nur schwer kultiviert werden konnten (Amann et al. 1995). Die in Umweltproben enthaltenen Mikroorganismen sind nur schwer zu kultivieren, da auf Grund unzureichender Kenntnis die Kultivierungsbedingungen im Labor nicht den Wachstumsbedingungen des Habitats entsprechen oder syntrophe Beziehungen zu anderen Mikroorganismen bestehen. Auf Kultivierung basierende Methoden unterschätzen daher die existierende mikrobielle Diversität häufig, sind jedoch zur Charakterisierung von Stoffwechseleigenschaften von Mikroorganismen notwendig. Molekularbiologische Methoden, die auf der Analyse von RNA, DNA und Proteinen basieren, sind daher sehr gut geeignet um mikrobielle Gemeinschaften in Umweltproben verhältnismäßig schnell zu charakterisieren. Für die Analyse einer Mikroorganismengemeinschaft wird eine durch PCR (polymerase chain reaction) vervielfältigte Fraktion der extrahierten DNA genutzt. Die Zielsequenz kann dabei die 16S rRNA oder funktionelle Gene sein. Der spezifische Nachweis funktioneller Gene ist Beleg für die Anwesenheit einer Spezies und deren Aktivität. So werden oft die für die dissimilatorische Sulfitreduktase kodierenden Gene als Nachweis für SRB genutzt (Karr et al. 2005).

Da die 16S rRNA auf Grund ihrer Konserviertheit als evolutionäres Chronometer fungiert, eignet sie sich zur Bestimmung der phylogenetischen Struktur in einer Umweltprobe und der Identifikation einzelner Spezies (Lane et al. 1985, Woese 1987). Bei der Verwendung 16S rRNA bindender Primer werden konservierte Regionen erfasst und das komplette darin kodierte Gen oder ein Teil des Gens vervielfältigt (Dams et al. 1988, Giovannoni et al. 1990). Für die Domäne *Bacteria* werden Primer verwendet, die an die V3 und V6/V9 Regionen und bei den *Archaea* an die V3 Region der 16S rRNA binden. Die Diversität der Bakteriengemeinschaft kann anschließend



## Einleitung

---

über die amplifizierten 16S rRNA Abschnitte und Fingerprinting-Techniken wie SSCP (Single-Strand Conformation Polymorphism) und DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) bestimmt werden. Diese Techniken basieren auf durch Mutationen hervorgerufenen Sequenzunterschieden in den nichtkodierenden Bereichen der DNA (Introns), den sogenannten Sequenzpolymorphismen und produzieren einen genetischen Fingerabdruck der mikrobiellen Gemeinschaft.

Beim Single-Strand Conformation Polymorphism (SSCP) werden die PCR-Produkte denaturiert und anschließend die einzelsträngigen DNA-Fragmente in einem Polyacrylamidgel durch Elektrophorese aufgetrennt (Schwieger & Tebbe 1998). Die Auftrennung der Sequenzen basiert dabei auf Unterschieden in der Basenabfolge, die zu einer unterschiedlichen räumlichen Faltung (Sekundärstruktur) und damit zu einem deutlich veränderten Laufverhalten der Sequenzen im Gel führt.

Im Gegensatz dazu wird bei der Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) die doppelsträngige DNA entlang eines denaturierenden Gradienten aus Harnstoff und Formamid in einem Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt (Muyzer et al. 1993). Sequenzunterschiede bei den PCR-Produkten führen dabei während der Denaturierung zu einem unterschiedlichen Schmelzverhalten, sodass PCR-Produkte mit unterschiedlicher Sequenz auf unterschiedlicher Höhe im Gel stoppen und eine Bande bilden. Der Vorteil beider Methoden besteht darin, dass eine große Anzahl von Proben parallel untersucht und die so erhaltenen genetischen Fingerprintings verglichen werden können. Durch die Ausbildung probenspezifischer Bandenmuster im Gel können Unterschiede in der mikrobiellen Zusammensetzung nachgewiesen oder über zeitliche Änderungen im Bandenmuster Verschiebungen in der Bakteriengesellschaft mit einem im Vergleich zur Kultivierung von Mikroorganismen geringen Aufwand angezeigt werden. Für die Identifizierung einzelner Spezies werden Banden aus dem Gel ausgeschnitten und sequenziert.

Die Limitierungen des genetischen Fingerprintings sind: (1) Die verschiedenen DNA-Extraktionsverfahren sind unterschiedlich effektiv (Martin-Laurent et al. 2001). (2) In der PCR kann es zu Fehlern beim Bindeverhalten der Primer kommen (Suzuki & Giovannoni 1996) und es werden zudem nur die in der mikrobiellen Gemeinschaft dominanten Mikroorganismen erfasst, indem die am meisten vorhandenen DNA Sequenzen amplifiziert werden, sodass unterrepräsentierte Organismen meist nicht detektiert werden. (3) Es steht nur eine begrenzte Sequenzinformation (<600 bp) zur phylogenetischen Analyse der DNA zur Verfügung, sodass teils keine direkte taxonomische Zuordnung für die Sequenzen möglich ist. Zudem weisen einige Mikroorganismen auf der 16S Ebene nur geringe Unterschiede auf (z.B. *Pseudomonaden*). (4) Durch Sequenzheterogenitäten innerhalb mehrerer rRNA Operone und dem Vorkommen von



## Einleitung

---

mehreren Genkopien in einem Bakterium kommt es zur Ausbildung mehrerer Banden im Gel, was wiederum eine optische Auswertung der Gele erschwert und zu einer Überschätzung der mikrobiellen Diversität führen kann. (5) DNA Fragmente können ähnliche Schmelztemperaturen haben, liegen dann im Gel auf einer Höhe und erschweren die Identifikation der Organismen.

Fluorescence *in situ* hybridisation (FISH) wird ebenfalls für die Analyse mikrobieller Gemeinschaften angewendet. Das Verfahren eignet sich zur phylogenetischen Identifikation und Zählung einzelner mikrobieller Zellen *in situ*, durch Hybridisierung der gesamten Zelle mit Oligonukleotiden, speziellen Nukleinsäure-Polymeren (Amann et al. 1995). Die Oligonukleotide enthalten am 5'Ende einen fluoreszierenden Farbstoff, der die Detektion der an zelluläre rRNA gebundenen Oligonukleotide mittels eines Epifluoreszenzmikroskops ermöglicht. Als Farbstoffe werden z.B. 5(6)-Carboxyfluorescein-N-hydroxy-succinimidester (FLUOS) oder der Carbocyaninfarbstoff Cy3 eingesetzt. Wie bei den PCR-basierten Methoden können dabei gezielt bestimmte, stoffwechselaktive Organismengruppen identifiziert werden. FISH kann in Kombination mit DAPI (4',6'-diamidino-2-phenylindole) dazu genutzt werden den Anteil einer Organismengruppe an der Gesamtpopulation zu ermitteln, da alle intakte DNA enthaltenen Mikroorganismen quantifiziert werden. Typische Probleme bei der FISH-Analyse sind eine zu geringe Signalintensität, Hintergrundfluoreszenz sowie Bindungsstellen, die nicht frei zugänglich sind. Jedoch wurde in den letzten Jahren die Methode weiter verbessert und es werden hellere Fluorochrome, Chloramphenicol zur Erhöhung des RNA Gehaltes in aktiven Bakterienzellen, mehrere Fluorochrome zur Hybridisierung, als auch Reporterenzyme zur Amplifikation des Signals eingesetzt (Rogers et al. 2007). Zudem wird mit DAPI neben lebenden Zellen auch die DNA inaktiver Zellen angefärbt.

### 1.5. Störungen im Betrieb geothermischer Anlagen

Bei der Nutzung geothermischer Anlagen kommt es gelegentlich zu Betriebsstörungen, die für den Anlagenbetreiber einen finanziellen Schaden bedeuten und im Extremfall sogar zur Stilllegung der Anlage führen. Die Ursachen für die an geothermischen Anlagen auftretenden Betriebsstörungen wurden bisher häufig nicht gefunden. Die in den Prozesswässern der Anlagen vorhandenen Mikroorganismen und die stattfindenden biogeochemischen Prozesse blieben dabei als Verursacher für Störungen weitgehend unberücksichtigt. Nur wenige Studien untersuchten bisher die biologischen Prozesse in Geothermieanlagen (Aragno et al. 1983, Wagner et al. 1988, Honegger et al. 1989, Fujino et al. 2008).

## Einleitung

---

Untersuchungen an Anlagen zur Entsalzung, Trinkwasseraufbereitung und -speicherung sowie zur Trinkwasserverteilung zeigten jedoch, dass Mikroorganismen durchaus an einer Reihe von Prozessen beteiligt sind, die zu Störungen in Anlagen führen können. Die für geothermische Anlagen relevanten Prozessstörungen werden im Folgenden kurz erläutert.

### **1.5.1. Biofouling und Scaling: Schädigungen durch Biofilme und mineralische Ablagerungen**

Biofilme, die meist als flächendeckender Überzug auf Materialien vorkommen, sind in technischen Anlagen meist unerwünscht und werden als mikrobielles Biofouling bezeichnet (Characklis 1990, Flemming 2002, Henderson 2010). In geothermischen Anlagen können Biofilme den Wärmetransport im Wärmetauscher herabsetzen, was wiederum die Energieausbeute der Anlage senkt (Characklis 1990). Häufig findet man Biofilme auch auf der Pumpe in der Bohrung, in der Verrohrung, im Brunnenfilter, im Filterkies, sowie im geklüfteten und porösen Gestein des Aquifers (Cullimore 1999). In den Biofilmen befinden sich oft amorphe oder kristalline Verkrustungen von Eisenoxiden und -hydroxiden, Karbonaten (Kalzite) und Eisensulfiden (Van Beek & van der Kooij 1982, van Beek 1989).

In geothermalen Fluiden kommt es zur Bildung karbonatischer Ausfällungen (Scales), wie Kalzit ( $\text{CaCO}_3$ ), Aragonit ( $\text{CaCO}_3$ , stabileres Polymorph als Kalzit bei hohen Temperaturen und Drücken) und Siderit ( $\text{FeCO}_3$ ), wenn Änderungen in den physikalischen Bedingungen wie Druck- und Temperaturabfall sowie Turbulenzen auftreten, die den  $\text{CO}_2$ -Partialdruck im geförderten Fluid beeinflussen (Ming 2002, Wolfgramm et al. 2011). Elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigten, dass die Mineralbildung eng an Bakterienzellen gebunden ist (Douglas & Beveridge 1998). Denn auf Grund des bei Bakterien hohen Oberflächen/Volumen-Verhältnisses und geladener chemischer Gruppen auf der Zelloberfläche stellen Bakterien Kristallisationskeime dar. Mikroorganismen tragen auch über die Bildung von Stoffwechselprodukten zur Ausfällung von Mineralen, der „mikrobielle induzierten Mineralisation“ bei. Zu den dabei am weitesten verbreiteten Ausfällungen gehören Karbonate, Hydroxide, Pyrite (Metallsulfide) und Silikate (Douglas & Beveridge 1998, Brown et al. 1999).

Die mikrobielle Umsetzung von Kohlenstoff ist eng an die Fällung und Lösung von Karbonaten gekoppelt, denn Mikroorganismen beeinflussen durch ihren Stoffwechsel den Gehalt an gelöstem organischen Material und  $\text{CO}_2$  in ihrer Umgebung. Die Karbonatlöslichkeit ist dabei abhängig vom pH-Wert,  $\text{CO}_2$ -Partialdruck und im Wasser vorkommenden karbonatbindenden Kationen, wie Calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) oder Magnesium ( $\text{Mg}^{2+}$ ) (Stumm & Morgan 1981, Inskeep & Bloom 1986).

## Einleitung

---

Ausgefallene Karbonate findet man als Überzüge auf Bodenpartikeln und in Porenräumen von Gestein. Dort können sie zur Verfestigung (Zementation) der Bodenpartikel führen.

Eisenoxidierer gelten als Hauptverursacher für durch Eisenhydroxide in Grundwasserbrunnen und Wasserleitungen hervorgerufene Verockerung (Cullimore & McCann 1978, Tuovinen & Nurmiäho 1979, Ridgway et al. 1981). Die Verockerung betrifft v.a. die Brunnenfilter und führt zu einer reduzierten Produktivität (Hässelbarth & Lüdemann 1967a, b, 1972, Ralph & Stevenson 1995, Barbic et al. 2000, de Mendonca et al. 2003).

Durch SRB gebildetes Sulfid kann mit im Fluid gelösten Metallen wie z.B. Eisen ( $\text{Fe}^{2+}$ ), Blei ( $\text{Pb}^{2+}$ ) und Zink ( $\text{Zn}^{2+}$ ) als Pyrit ausfallen. Bei hydrothermalen Fluiden tritt dieser Prozess verstärkt bei der Abkühlung von Formationswässern auf (Reed & Palandri 2006).

Die Bildung amorpher Silikate wird bei hydrothermalen Quellen aber auch in Geothermieranlagen beobachtet (Inagaki et al. 1997, Fujino et al. 2008). So kommt es durch das Aufsteigen geothermaler Fluide aus hydrothermalen Quellen und der damit einhergehenden starken Verdampfung und Abkühlung des Fluids zu teils massiven Silikatausfällungen. Extrem thermophile Bakterien wie z.B. *Aquificales*, *Thermus* und *Hydrogenobacter* scheinen an diesen Prozessen beteiligt zu sein (Blank et al. 2002, Inagaki et al. 2003).

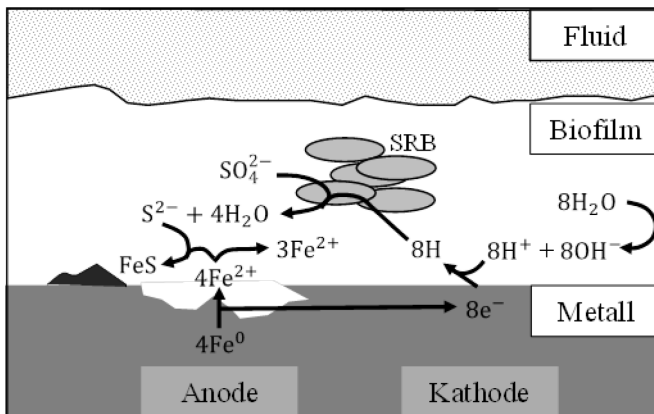
### 1.5.2. Korrosion: Schädigung metallischer Werkstoffe

In wasserführenden Systemen werden eisenhaltige Metalle nicht nur durch rein chemische und elektrochemische Prozesse korrodiert sondern auch durch die Aktivität von Mikroorganismen, in der sogenannten „mikrobiell induzierten Korrosion“ (microbial induced corrosion, MIC). MIC trägt daher dazu bei die Lebensdauer metallischer Bauteile drastisch zu reduzieren und ruft enorme Kosten hervor (Postgate 1984, Hamilton 1985, Tiller 1988, Flemming 1996). Während in aeroben Habitaten v.a. Schwefeloxidierer (z.B. *Acidithiobacillus thiooxidans*) durch die Bildung von Schwefelsäure für Korrosion verantwortlich sind, so sind in anoxischen Habitaten vor allem SRB, wie *Desulfovibrio*, *Desulfotomaculum* und *Desulfomonas* relevant (Hamilton 1985, 2003, Pankhania 1988, Lee et al. 1995). Das die anaerobe Korrosion durch die Aktivität von SRB hervorgerufen wird, wurde erstmals 1934 durch von Wolzogen Kuehr und van der Vlugt unter dem Begriff „Kathodische Depolarisation“ publiziert. Die dem Prozess der anaeroben Korrosion zu Grunde liegenden Mechanismen wurden in den darauffolgenden Jahren mehrfach modifiziert (Videla & Herrera 2005). In Abbildung 2 sind die an Metalloberflächen stattfindenden Prozesse und zu Korrosion führenden Reaktionen dargestellt. In den anodischen Bereichen des Metalls geht Eisen ( $\text{Fe}^{2+}$ ) in Lösung. Wiederum reduzieren in den kathodischen Bereichen freigesetzte

## Einleitung

Elektronen die aus dem Wasser stammenden Protonen und bilden Wasserstoff. Sulfatreduzierende Bakterien nutzen den Wasserstoff und bilden Sulfid, das mit dem gelösten Eisen ausfällt. Durch die Bindung des Eisens schreitet die anodische Dissoziation des Metalls voran.

Ein hoher Salzgehalt im Fluid und durch Mikroorganismen produzierte organische Säuren wirken sich zusätzlich negativ auf die Metalleigenschaften aus und begünstigen die Zerstörung des Metalls durch Korrosion (Gaylarde & Beech 1988, Sand 1996). Die Konzentration an Chloridionen und organischen Säuren kann in der EPS von auf dem Metall befindlichen Biofilmen besonders hoch sein. Neben Chlorid zählt Sulfat zu den für Korrosion verantwortlichen aggressiven Ionen. Der Chlorid- und Sulfatgehalt im Verhältnis zum Karbonat- und Bikarbonat-Gehalt ist für die Abschätzung der korrosiven Eigenschaften des Formationsfluids ausschlaggebend (Valdez et al. 2009).



**Abb. 2.** Schematische Darstellung der anaeroben Korrosion von Eisen bei der SRB beteiligt sind. Die Mikroorganismen sind frei im Biofilm dargestellt. *In situ* sind sie jedoch meist in einem sehr engen Kontakt mit der Metalloberfläche. (modifiziert nach Mori et al. 2010)

## 2. Zielsetzung der Arbeit

In der vorliegenden Doktorarbeit sollen die Kenntnisse über die in geothermisch genutzten Aquifern vorhandenen Mikroorganismen erweitert werden. Im Speziellen sollen die Ergebnisse dazu dienen die Auswirkungen mikrobiologischer Prozesse im Aquifer und der obertägigen Anlage zu verstehen, sodass die Häufigkeit mikrobiell bedingter Betriebsstörungen herabgesetzt wird. Wartungskosten könnten so reduziert, die veranschlagte Nutzungsdauer der untertägigen Installation verlängert und die Wertschöpfung der Anlage verbessert werden.

Im Mittelpunkt der Arbeit steht die Charakterisierung mikrobieller Gemeinschaften in Fluid- und Feststoffproben von vier geothermischen Anlagen im Norddeutschen Becken, die sich in der Tiefe des Aquifers, der Temperatur und Salinität des Fluids, sowie bezüglich der im Fluid gelösten organischen und anorganischen Bestandteile unterscheiden. Änderungen in der mikrobiellen Zusammensetzung über die Zeit und in Abhängigkeit vom Betrieb der Anlagen sollen dokumentiert und bewertet werden. Zudem sind die Auswirkungen mikrobieller Prozesse auf den Anlagenbetrieb, insbesondere deren Relevanz für an den Anlagen auftretende Betriebsstörungen zu untersuchen. Dabei gilt es Indikatororganismen zu identifizieren, anhand derer die Ursachen für die an den Anlagen beobachteten Prozessstörungen abgeleitet werden können.

## 3. Ergebnisse

In Kapitel 3 sind die Ergebnisse der Dissertation in Form von drei Veröffentlichungen präsentiert. Die ersten Beiden sind bereits veröffentlicht. Die dritte Publikation wurde gereviewt (minor revisions) und ist für die Publikation in der Zeitschrift *Extremophiles* akzeptiert.

### **Veröffentlichung 1**

Lerm, S., Alawi, M., Miethling-Graff, R., Seibt, A., Wolfgramm, M., Rauppach, K., Würdemann, H. 2011. Mikrobiologisches Monitoring in zwei geothermisch genutzten Aquiferen Norddeutschlands. *Zeitschrift geologischer Wissenschaften* 39 (3-4):195-212.

### **Veröffentlichung 2**

Lerm, S., Alawi, M., Miethling-Graff, R., Wolfgramm, M., Rauppach, K., Seibt, A., Würdemann, H. 2011. Influence of microbial processes on the operation of a cold store in a shallow aquifer: impact on well injectivity and filter lifetime. *Grundwasser* 14(2):93-104.

### **Veröffentlichung 3**

Lerm, S., Alawi, M., Miethling-Graff, R., Wolfgramm, M., Rauppach, K., Seibt, A., Würdemann, H. Thermal effects on microbial composition and microbiologically induced corrosion and mineral precipitation affecting operation of a geothermal plant in a deep saline aquifer. Akzeptiert zur Veröffentlichung in der Zeitschrift *Extremophiles*

Diese Doktorarbeit wurde im Rahmen des durch das Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit geförderten Projektes “AquiScreen” (Kennzeichen: 0327634) erstellt. In diesem Projekt wurden mehrere Arbeitspakete durch Geologen, Mineralogen, Biochemikern und Mikrobiologen bearbeitet. Zur Interpretation und umfassenden Diskussion der Ergebnisse wurden die von den Projektpartnern erarbeiteten Ergebnisse in diese Arbeit aufgenommen und die Partner sind als Co-Autoren an den Veröffentlichungen beteiligt.

Die Veröffentlichungen wurden von Stephanie Lerm, betreut durch Dr.-Ing. Hilke Würdemann, geschrieben, zusammengestellt und illustriert. Für die Standorte Rostock, Neuruppin und Neubrandenburg wurden die SSCP-Analysen durch das Labor Amodia Bioservice GmbH durchgeführt (100 %), weil zu Beginn der Langzeituntersuchungen noch kein Labor am GFZ zur Verfügung stand. Für den Standort Berliner Reichstag wurden die SSCP-Analysen zum Nachweis von *Bacteria* zu 50 % durch Stephanie Lerm und zu 50 % durch das Labor Amodia Bioservice GmbH durchgeführt. Desweiteren wurden die DGGE-Analysen zum Nachweis von SRB und die fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen (FISH und DAPI-Färbung) zum Nachweis und zur

## Ergebnisse

---

Quantifizierung von Zellen in Fluid- und Filterproben des Kältespeichers am Berliner Reichstag zu 100 % von Stephanie Lerm durchgeführt. Für den Standort Neubrandenburg wurde der spezifische Nachweis von SRB durch Rickard Lindner, unter der Anleitung von Dr. Mashal Alawi durchgeführt. Die Untersuchungen mit der real-time PCR zur Quantifizierung der *Bacteria* und SRB in Fluiden von Neubrandenburg fanden durch Anke Westphal statt.

Dr. Markus Wolfgramm und Kerstin Rauppach (beide von der Firma Geothermie Neubrandenburg, GTN) führten die mineralogischen Untersuchungen am Rasterelektronenmikroskop durch (100 %). Die Gasmessungen an den Fluiden, die Bestimmung der in den Fluiden gelösten anorganischen Komponenten wurde zu 100 % durch Dr. Andrea Seibt (Boden Wasser Gesundheit GbR, BWG) durchgeführt. Dr. Rona Miethling-Graff und Dr.-Ing. Hilke Würdemann trugen zur Diskussion und Interpretation der Ergebnisse bei und waren an der Strukturierung der Veröffentlichungen beteiligt (Gesamtanteil 30 %). Dr. Mashal Alawi unterstützte die molekularbiologischen Untersuchungen im Labor und die DNA-Sequenzanalysen

### **3.1. Mikrobiologisches Monitoring in zwei geothermisch genutzten Aquiferen Norddeutschlands**

*Erste Veröffentlichung: erschienen 2011 in Zeitschrift geologischer Wissenschaften (ZGW) 39(3/4): 195-212)*

**Autoren:** **Stephanie Lerm**<sup>1</sup>, Mashal Alawi<sup>1</sup>, Rona Miethling-Graff<sup>1</sup>, Andrea Seibt<sup>2</sup>, Markus Wolfgramm<sup>3</sup>, Kerstin Rauppach<sup>3</sup>, Hilke Würdemann<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Helmholtz Centre Potsdam GFZ German Research Centre for Geosciences, International Centre for Geothermal Research ICGR, Telegrafenberg, D-14473 Potsdam, Germany

<sup>2</sup> Boden Wasser Gesundheit GbR. (BWG), D-17041 Neubrandenburg, Germany

<sup>3</sup> Geothermie Neubrandenburg (GTN), D-17041 Neubrandenburg, Germany



**Keywords:** Aquifer, Geothermie, Mikroorganismen, Diversität, PCR-SSCP

### 3.1.1. Summary

Within the context of assessing the potential of microorganisms to affect the operational reliability of geothermal plants the microbial diversity in two geothermal aquifers of the North German Basin (shallow heat-store and deep geothermal aquifer) was investigated by molecular PCR-SSCP (polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism) analysis of bacterial partial 16S rRNA genes. Comparative genetic profiling of fluids, deriving from aquifers located in 15-25 m and 1.700 m depth, revealed different microbial phylogenetic lineages, despite of partly high temperature (63 °C), high salinity (200 mg l<sup>-1</sup>) and low DOC (dissolved organic carbon) -content down to 0.2 mg C l<sup>-1</sup>. Fluids of the heat-store aquifer were characterized by Beta-, Delta-, Epsilon-, Gamma-*Proteobacteria*, *Verrucomicrobia* and *Clostridia*, covering the range of chemolithotrophic to chemoorganotrophic metabolism. Cycling of nutrients, like iron and sulphur compounds, played an essential role in the habitat. The detection of phototrophic *Chloroflexi* and *Chlorobi* in filters indicated seeping surface water, interacting with the aquifer. The biocenosis of the saline geothermal aquifer was characterized by organic matter degrading Alpha-, Beta-, Gamma-*Proteobacteria*, *Clostridia* and *Bacteroidetes*. The detected microbial community was probably influenced by organic substances, introduced by drilling and well completion procedures during plant installation or workover procedures to the surrounding of the well. The decrease in the DOC (dissolved organic carbon) -content in fluid within 19 months in the course of plant operation and a TOC (total organic carbon) -content of 15 % in the sediment of the production well indicate organic residuals of drilling fluids in the well. This study demonstrates that a diverse microbial community in geothermal plants may exist even under extreme conditions and such surveys can contribute to characterize the biological and chemical processes in engineered geothermal aquifers (in addition, see Westphal et al. EGU 2011).

### 3.1.2. Zusammenfassung

Ziel der durchgeführten Untersuchungen ist die Charakterisierung mikrobieller Prozesse in geothermischen Anlagen. Die mikrobielle Diversität in zwei geothermisch genutzten Aquiferen des Norddeutschen Beckens (oberflächennaher Wärmespeicher und saliner geothermischer Aquifer) wurde mit der molekularbiologischen PCR-SSCP (polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism) -Analyse bakterieller 16S rRNA Gene untersucht. Die vergleichende Analyse der genetischen Fingerprint-Profile der 15-25 m und 1.700 m tief gelegenen Aquifere zeigte, dass trotz teils extremer Standortbedingungen, wie hoher Temperatur (63 °C), hoher Salinität (200 mg l<sup>-1</sup>) und geringen DOC (dissolved organic carbon) -Gehalten von bis zu 0,2 mg C l<sup>-1</sup> Mikroorganismen unterschiedlicher phylogenetischer Klassen in den Fluiden nachweisbar waren. Bakterien der Beta-, Delta-, Epsilon- und Gamma-*Proteobacteria*, *Verrucomicrobia* und *Clostridia*, die durch einen chemolithoautotrophen oder chemoorganotrophen Stoffwechsel charakterisiert sind, klassifizierten den Wärmespeicher als typisch oberflächennahes Grundwasser. Dabei spielten Bakterien mit der Fähigkeit zur oxidativen und reduktiven Umsetzung von Eisen- und Schwefelverbindungen eine zentrale Rolle im Habitat. Der Nachweis von *Chloroflexi* und *Chlorobi* Vertretern in den Filtern deutete darüber hinaus eine Beeinflussung des oberflächennah gelegenen Wärmespeichers durch versickerndes Oberflächenwasser an. Im tiefer gelegenen salinen Aquifer war die Biozönose aus Bakterien der Alpha-, Beta-, Gamma-*Proteobacteria*, *Clostridia* und *Bacteroidetes* zusammengesetzt, die überwiegend durch einen chemoorganotrophen, häufig fermentativen Stoffwechsel charakterisiert sind. Die nachgewiesene mikrobielle Biozönose war dabei möglicherweise durch den Eintrag von Organik beeinflusst, auf den der, innerhalb von 19 Monate nach Inbetriebnahme der Anlage stark gesunkene DOC-Gehalt im Fluid und ein TOC (total organic carbon) -Gehalt von 15 % im Bohrsumpf der Injektionsbohrung hinweist.

Diese Studie zeigt, dass eine diverse mikrobielle Biozönose in geothermischen Anlagen unter teils extremen Bedingungen existieren kann und entsprechende Forschungsansätze dazu beitragen die biologischen und chemischen Prozesse in technisch genutzten geothermischen Aquiferen zu charakterisieren.

### 3.1.3. Einleitung

Fluide, die aus einem bis zu mehreren hundert Meter tief gelegenen Speichergestein gefördert werden, können als Träger thermaler Energie für balneologische Anwendungen und zur Beheizung von Gebäuden oder bei entsprechend hoher Temperatur und Produktivität auch zur Stromerzeugung genutzt werden. Geothermische Anlagen leisten somit einen wichtigen Betrag zur umweltverträglichen Energiebereitstellung und wurden in den letzten Jahren zunehmend in geologisch geeigneten Gebieten Deutschlands, d.h. dem Norddeutschen Becken, dem Oberrheingraben und dem Molassebecken in Betrieb genommen. Geothermische Anlagen des Norddeutschen Beckens werden v.a. zur Speicherung von Wärme und Kälte und für balneologische Zwecke genutzt. Die mit dem Betrieb der Anlagen verbundene Produktion und Injektion von Fluid aus und in den Aquifer führt zu thermodynamischen (Druck, Temperatur) und biochemischen Veränderungen im System, die trotz der steigenden Zahl geothermischer Anlagen bisher nur in wenigen Studien untersucht wurden (Näveke et al. 1992, Köhler et al. 1997, 1997a, Inagaki et al. 2003, Sand 2003, Brielmann et al. 2009). In zahlreichen Studien wurden aktive bakterielle Biozönosen in geologischen Strukturen bis zu mehreren Kilometern Tiefe nachgewiesen (Fredrickson et al. 1995, Head et al. 2003, Parkes et al. 1994, Pedersen 2000, Whitman et al. 1998). Eine „Tiefe Biosphäre“ mit autochthonen (einheimischen) bakteriellen Biozönosen ist somit seit etwa 15 Jahren wissenschaftlich anerkannt. In Analogie zur ubiquitären Präsenz von Mikroorganismen in oberflächennahen aquatischen und terrestrischen Habitaten, in denen sie ihre Umgebung durch vielfältige Ab- und Aufbauprozesse verändern, ist davon auszugehen, dass mikrobielle Stoffwechselprozesse auch geothermisch genutzte Aquifere und deren obertägige Anlagen beeinflussen. Die mikrobiologischen Aspekte bei der Nutzung von Aquiferen wurden bisher nicht systematisch bearbeitet, obwohl sie die Injektivität der Bohrungen, als auch die Beständigkeit der verwendeten Materialien beeinträchtigen können.

Moderne molekularbiologische Methoden, die auf der Untersuchung des genetischen Materials von Bakterien (DNA und RNA) beruhen, tragen dabei entscheidend zu dem Wissenszuwachs über mikrobielle Biozönosestrukturen im Untergrund bei (Hugenholtz et al. 1998). Dennoch ist das Wissen über die mikrobielle Diversität und dominierende Stoffwechselprozesse in unterirdischen Habitaten noch sehr lückenhaft. Bisherige Studien sind meist auf marine Tiefseesedimente und heiße Quellen beschränkt (Parkes et al. 1994,

## Ergebnisse

---

Takai & Horikoshi 1999, Sievert et al. 2000, Teske et al. 2002, Amend & Teske 2005, Beatty et al. 2005, Nakagawa et al. 2005). Das liegt unter anderem daran, dass die Möglichkeiten, Proben aus der „Tiefen Biosphäre“ zu erhalten, durch den erschwerten Zugang zu entsprechenden Habitaten beschränkt sind. Erst durch das Abteufen von Bohrungen und den Bau oberflächiger Anlagen kann Probenmaterial gewonnen werden. Aber selbst oberflächennahe Systeme wie anoxische Frischwassersedimente sind durch die vorherrschenden heterogenen Umweltparameter, wie Temperatur, Wasserchemie und Nährstoffverfügbarkeit bisher nur unvollständig verstanden (Roden & Wetzel 2003, Briée et al. 2007, Kjeldsen et al. 2007, Brielmann et al. 2009). Geothermische Aquifere stellen mit zunehmender Tiefe ein Extremhabitat für Mikroorganismen dar, das durch die Parameter Temperatur, Druck, Salzgehalt, pH-Wert, geringes Nährstoffangebot und anoxische Bedingungen charakterisiert ist.

Aus tiefen unterirdischen Habitaten isolierte Gensequenzen konnten verschiedenen Linien der Prokaryoten-Systematik zugeordnet werden. Vielfach war allerdings noch keine eindeutige systematische Zuordnung der gefundenen Gensequenzen möglich, die eine wesentliche Voraussetzung für eine Ableitung der mikrobiell katalysierten Prozesse ist. Ursache für die große Anzahl an unkultivierten Organismen in den Gendatenbanken ist die meist sehr zeitaufwendige Kultivierung und Beschreibung der Organismen in ihrem Stoffwechsel. Unzureichendes Wissen in Bezug auf die Wachstumsbedingungen oder syntrophe Stoffwechselbeziehungen zu anderen Organismen erschweren eine Kultivierung im Labor. Eine detaillierte Charakterisierung der Mikroorganismen und der von ihnen katalysierten Stoffwechselprozesse ist wiederum notwendig, um die biologisch katalysierten Prozesse in geologischen Strukturen zu bestimmen und diese in Hinblick auf die technische Nutzung von Aquiferen zu bewerten. Voraussetzung für mikrobielles Leben im Aquifer sind Energie- und Kohlenstoffquellen. Habitate im Untergrund sind, sofern sie nicht anthropogen kontaminiert wurden, durch das Alter der geologischen Formation und dem nur langsamen Zustrom von Infiltrationswässern von der Oberfläche, meist arm an biologisch abbaubarer organischer Substanz. So macht es vor allem die physiologische Anpassungsfähigkeit der Mikroorganismen möglich, derart nährstoffarme Habitate mikrobiell zu besiedeln und den auf in den Sedimenten vorhandenen oder durch Auswaschen aus den darüber liegenden Bodenzonen gelösten organischen Kohlenstoff abzubauen (Murphy et al. 1992, Fredrickson et al. 1995). Der Stoffwechsel, der in unterirdischen Habitaten vorkommenden

## Ergebnisse

---

Mikroorganismen ist daher auf Elektronenakzeptoren, wie Sulfat ( $\text{SO}_4^{2-}$ ), Nitrat ( $\text{NO}_3^-$ ), Eisen ( $\text{Fe}^{3+}$ ) und oxidierbare organische oder anorganische Stoffe angewiesen (Murphy et al. 1992, Fredrickson et al. 1995, Lovley et al. 1996). Sowohl der auf organischen Verbindungen basierende chemoorganotrophe als auch fermentative Abbau von Zuckern, Peptiden, Aminosäuren oder organischen Säuren dient den Bakterien zur Gewinnung von Energie zur Lebenserhaltung und Vermehrung. Darüber hinaus begünstigen nährstoffarme Bedingungen Organismen, die über einen chemolithoautotrophen, von organischer Substanz unabhängigen Stoffwechsel verfügen (Amend & Shock 2001). Chemolithoautotrophe Organismen benötigen für Wachstum und Reproduktion neben  $\text{CO}_2$  als Kohlenstoffquelle nur Wasser, Mineralien und reduzierbare Gase, wie Wasserstoff oder anorganische Verbindungen, die kontinuierlich aus den geologischen Strukturen austreten (Parkes et al. 2000, Nealson et al. 2005). Mikroorganismen kommen im Untergrund meist nicht planktonisch vor, sondern sind durch spezielle zelluläre Strukturen aus Organismen und der von ihnen abgesonderten extrapolymeren Substanz (EPS) an Gesteinsoberflächen gebunden (Meyer-Reil 1994). Dort bilden sie durch die enge räumliche Beziehung zwischen Mikroorganismen unterschiedlicher Stoffwechseltypen komplexe ökologische Systeme aus, die auch als Biofilme bezeichnet werden. Insbesondere in nährstoffarmen Habitaten ist die Ausbildung von Biofilmen für Mikroorganismen von großem Vorteil, da sich in ihnen Stoffe anreichern können (Wolfaardt et al. 1999). Biofilme bieten darüber hinaus Schutz gegen starke Selektionsdrücke der Umgebung, wie z.B. Strömungsgeschwindigkeit und Salinität.

Zur Untersuchung mikrobieller Biozöosen aus Umweltproben stehen verschiedene molekularbiologische Techniken zur Verfügung (Amann et al. 1997). Diese bieten gegenüber klassischen mikrobiologischen Methoden den Vorteil, dass sie unabhängig von einer Kultivierung Mikroorganismen nachweisen können. Mit Einführung der PCR (polymerase chain reaction) Ende der 80-iger Jahre ergaben sich für mikrobiologisch-ökologische Untersuchungen neue Möglichkeiten. So geht man heute davon aus, dass nur etwa 1% aller Mikroorganismen durch eine Kultivierung erfasst wird und somit die Vielfalt eines Habitats mit klassischen Methoden nur unzureichend beschrieben werden kann (Torsvik & Ovreas 2002). Für die molekularbiologische Charakterisierung der Diversität wird das universelle, für die kleine Untereinheit der Ribosomen kodierende 16S rRNA-Gen verwendet, wobei der Einsatz verschiedener Primer (Startermoleküle) die Untersuchung spezifischer Bakteriengruppen ermöglicht. Zur Darstellung der Biozönose werden die amplifizierten 16S

## Ergebnisse

---

rDNA Genabschnitte gleicher Größe durch eine Gelelektrophorese sequenzspezifisch aufgetrennt und angefärbt. Das somit erzeugte Bandenmuster (Fingerprint) ist charakteristisch für die untersuchte Biozönose und erfasst ihre dominanten Arten. Die Bandenintensität spiegelt die relative Häufigkeit der Spezies wider. Auf diesem Prinzip beruhende genetische Fingerprint-Methoden wie z.B. SSCP (single strand conformation polymorphism, Schwieger & Tebbe 1998), tRFLP (terminaler Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus, Liu et al. 1997) oder DGGE-Analysen (denaturing gradient gel electrophoresis, Muyzer et al. 1993) ermöglichen es, viele Proben routinemäßig miteinander zu vergleichen und Ähnlichkeiten oder Unterschiede zwischen verschiedenen Biozönosen zu erkennen. Dominante Organismen können über eine Sequenzierung der DNA phylogenetisch eingeordnet werden, wodurch Rückschlüsse auf die katalysierten Stoffumsetzungen möglich sind.

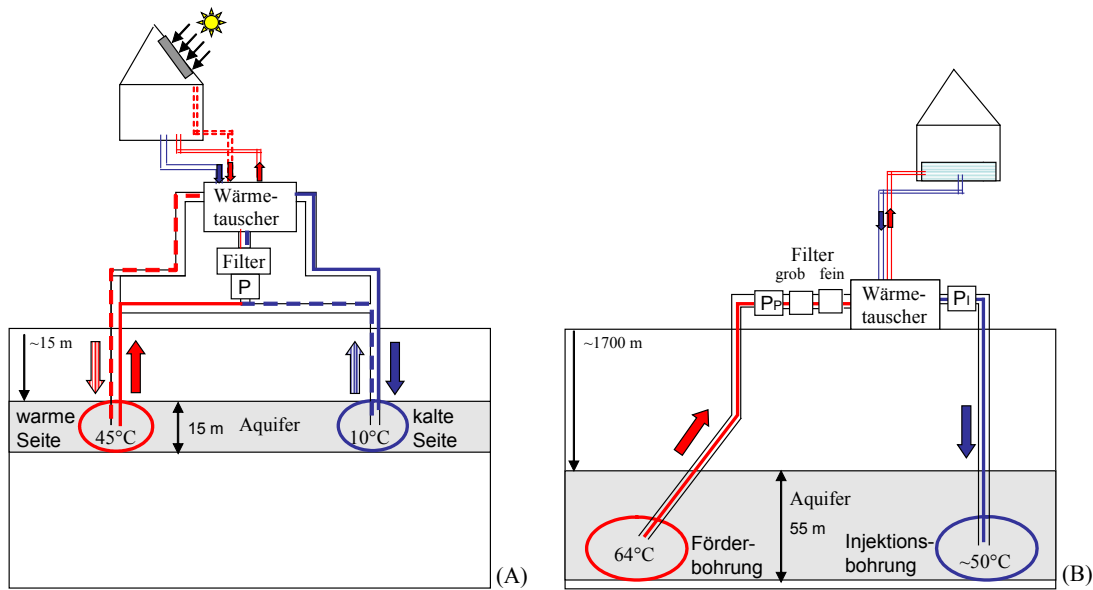
In dieser Studie wurde die mikrobielle Diversität in zwei geothermischen Anlagen durch PCR-SSCP Analysen charakterisiert. Die Anlagen erschließen unterschiedlich tief gelegene Aquifere im Norddeutschen Becken, die sich neben der Tiefe in ihren geochemischen Eigenschaften unterscheiden. Die Identifizierung von dominanten Mikroorganismen soll erste Hinweise auf die Bedeutung mikrobieller Stoffwechselprozesse für den Anlagenbetrieb liefern. Das Monitoring an den beiden geothermischen Anlagen wurde anhand von Fluid- und Filterproben über einen Zeitraum von 9 bzw. 26 Monaten durchgeführt. Unter Einbeziehung chemischer und mineralogischer Untersuchungsergebnisse werden erste Rückschlüsse auf die im Aquifer dominierenden Stoffwechselprozesse gezogen.

### **3.1.4. Material und Methoden**

#### **Standortcharakteristika**

Die Untersuchungen wurden im Norddeutschen Becken an einem mit Solarenergie gespeisten Wärmespeicher in Rostock (Helios) und einem zur Fernwärmeversorgung und für balneologische Zwecke genutzten Aquifer in Neuruppin durchgeführt. Die Aquifere unterscheiden sich in ihrer Teufe, Temperatur, chemischen Charakteristika sowie der Betriebsdauer und -weise der geothermischen Anlage (Abb. 1, Tab. 1). Während in Rostock eine alternierende Betriebsweise stattfand, wurde in Neuruppin stets nur aus einer Bohrung gefördert und in die andere Bohrung re-injiziert.

# Ergebnisse



**Abb. 1** Schematische Darstellung des Solar-Wärmespeichers in Rostock (A) und der geothermischen Anlage in Neuruppin (B) mit Kennzeichnung der Stellen an denen in der oberirdigen Anlage Fluid (P<sub>p</sub> Probenahmestelle an der Produktionsbohrung, P<sub>i</sub> Probenahmestelle an der Injektionsbohrung) und Filterproben entnommen wurden. (A) Die Pfeile zeigen die Fließrichtung des Fluids im Einspeichermodus (Sommer, gestrichelt) und Ausspeichermodus (Winter, glatt). (B) Die Pfeile kennzeichnen die Produktions- und Injektionsbohrung. P Probenahmestelle

**Tab. 1** Charakteristika der geothermischen Aquifere in Rostock und Neuruppin

	Speichergestein	Inbetriebnahme	Teufe [m]	Temp. [°C]	max. Fließrate [m <sup>3</sup> h <sup>-1</sup> ]	pH	Salinität [g l <sup>-1</sup> ]	Redox-potential SHE [mV]	DOC [mg l <sup>-1</sup> ]	Sulfat [mg l <sup>-1</sup> ]	Eisen [mg l <sup>-1</sup> ]	gelöste Gase [Vol.%]	Strömungs-umkehr
Solar-Wärmespeicher Rostock (Helios) (A)	Sand	2000	15-25	10/45	15	7,2	< 1	90-143	2,8	230	1,2	n.b.	Februar/November
Geothermische Anlage Neuruppin (Seetorviertel) (B)	Sandstein	2007	1.700	63/50	50	5,7	200	-58	7,9 - 0,2	3.100	25	CO <sub>2</sub> 88,6 N <sub>2</sub> 10,9 CH <sub>4</sub> 0,2	-

n.b. nicht bestimmt

## Solar-Wärmespeicher zur Wärmeversorgung in Rostock (Helios)

Der Solar-Wärmespeicher Helios ist über zwei Bohrungen im Abstand von 55 m erschlossen und ist seit 2000 in Betrieb (Abb. 1A). Der in 15 bis 25 m Tiefe gelegene Aquifer besteht aus Sanden des Pleistozäns und verfügt betriebsbedingt über eine warme und kalte Seite. Abhängig vom Speichermodus wird Fluid aus der warmen oder kalten Bohrung mit rund 15 m<sup>3</sup> h<sup>-1</sup> gefördert und in die entsprechend andere Bohrung re-injiziert (Seibt & Kabus 2006). Von März bis Oktober wird das aus dem Aquifer geförderte Fluid durch Solarkollektoren erwärmt und in die warme Aquiferseite injiziert (Einspeichermodus). Von November bis Februar ist die Fließrichtung umkehrt, damit die warme Aquiferseite zur Wärmeversorgung der angeschlossenen Wohnsiedlung genutzt werden kann (Ausspeichermodus). Zu Beginn der



## Ergebnisse

---

Ausspeicherphase beträgt die Produktionstemperatur des Fluids maximal 45 °C. Im Verlauf des Ausspeicherprozesses fällt die Temperatur bis auf die natürliche Grundwassertemperatur von etwa 10 °C ab. Das Prozesswasser lässt sich auf Grund der geringen Salinität ( $< 1 \text{ g l}^{-1}$ ), dem pH-Wert von 7,2 und einem Redoxpotential von 90-143 mV als typisches oberflächennahes Grundwasser klassifizieren. Die Sulfatkonzentration beträgt durchschnittlich  $230 \text{ mg l}^{-1}$ . Der DOC (dissolved organic carbon) -Gehalt liegt durchschnittlich bei  $2,3 \text{ mg C l}^{-1}$  (Vetter et al. 2011). Die Isotopensignatur des DOC ( $\delta^{13}\text{C}_{\text{DOC}}$ ) im Fluid beträgt durchschnittlich -27,2 ‰. Die Konzentration niedermolekularer organischer Säuren liegt unterhalb der Nachweisgrenze von  $0,2 \text{ mg l}^{-1}$  (Vetter et al. 2011).

### **Geothermische Anlage zur Balneologie in Neuruppin (Seetorviertel)**

Die 2007 in Betrieb genommene geothermische Anlage verfügt über zwei Tiefbohrungen (Dublette), deren Endteufe in 1.700 m (Förderbohrung) bzw. 1.675 m (Injektionsbohrung) liegt (Abb. 1B). Der verfilterte Bereich der beiden Bohrungen liegt in einem Abstand von 770 m, so dass eine Durchmischung des zu produzierenden und re-injizierten Fluids längerfristig vermieden wird. Das Reservoirgestein ist ein 54 m mächtiger Aalensandstein. Das Schichtwasser hat einen pH-Wert von 5,7, ein Redoxpotential (SHE) von -58 mV, sowie eine Temperatur von 63 °C. Der TDS (total dissolved solid) -Gehalt ist mit  $200 \text{ g l}^{-1}$  für die Aquifertiefe von 1.700 m hoch. Hauptbestandteile sind dabei Natrium ( $72 \text{ g l}^{-1}$ ) und Chlorid ( $120 \text{ g l}^{-1}$ ), weshalb das Fluid dem Na-Cl-Typ zuzuordnen ist. Calcium und Magnesium liegen in Konzentrationen von  $1.800 \text{ mg l}^{-1}$  bzw.  $1.100 \text{ mg l}^{-1}$  vor. Die Sulfatkonzentration im Fluid beträgt rund  $3.100 \text{ mg l}^{-1}$ . Im Tiefenwasser sind 10 % Gas gelöst, das sich hauptsächlich aus Kohlendioxid (88,6 Vol.-%) zusammensetzt. Neben Stickstoff (10,9 Vol.-%) enthält es noch 0,2 Vol.-% Methan.

Dem aus dem Aquifer geförderten Fluid wird über einen Wärmetauscher in der obertägigen Anlage Wärme entzogen. Das abgekühlte Wasser wird über die Injektionsbohrung in den Aquifer re-injiziert. Der Bedarf an Tiefenwasser beschränkt sich auf etwa  $25 \text{ m}^3$  pro Tag für die balneologische Nutzung. Der Gehalt an gelösten organischen Kohlenstoffverbindungen (DOC) lag, vier Monate nach Inbetriebnahme der Anlage, im Fluid der Injektionsbohrung bei maximal  $7,9 \text{ mg l}^{-1}$  und sank im Beobachtungszeitraum auf Werte unterhalb



# Ergebnisse

---

(Produktionsbohrung) bzw. nahe der Nachweisgrenze von 0,2 mg l<sup>-1</sup> (Injektionsbohrung). Kurzkettige Fettsäuren wurden nicht nachgewiesen (Würdemann et al. 2010).

## Probenahmen

Bei beiden Anlagen wurden aus dem laufenden Betrieb Proben aus dem Prozesswasser und aus den Filtereinheiten (Filtrationsrückstand, im Weiteren als Filterproben bezeichnet) entnommen (Tab. 2, Tab. 3). Die Fluidproben wurden an speziellen Probenahmestellen entnommen, die den Filtertöpfen der Anlage vorgeschaltet sind, und in sterile 1L Schott Duran Glasflaschen gefüllt. Zusätzlich wurde in Neuruppin das Fluid nach der Passage durch den Wärmetauscher, kurz vor der Re-Injektion beprobt. Die Filterproben stammen aus Filtertöpfen, die dem Wärmetauscher der jeweiligen Anlage vorgeschaltet sind. Die Polypropylen-Filter des Solar-Wärmespeichers in Rostock weisen Maschenweiten von 10 µm auf (EATON, Cleveland, USA). Bei der geothermischen Anlage in Neuruppin wird zwischen Grobfilter und Feinfilter aus Polypropylen unterschieden (Maschenweiten 20µm bzw. 2µm, EATON, Cleveland, USA). Am Ende eines Leistungstests im Juni 2008 erfolgte an der Injektionsbohrung der Anlage in Neuruppin eine Tiefenprobenahme. Dabei wurde Sediment gefördert, das ebenfalls untersucht wurde.

**Tab. 2** Fördertemperatur und Betriebsweise des Solar-Wärmespeichers in Rostock während der Probennahmen

Betriebsweise	Probe	Datum	Förder- temperatur [°C]
Ausspeichern	Fluid, Filter	27.03.2008	14
	Fluid, Filter	18.11.2008	21
	Fluid, Filter	17.12.2008	16
Einspeichern	Fluid	17.10.2006	18
	Fluid, Filter	30.05.2007	12
	Fluid	25.09.2007	11
	Fluid, Filter	27.05.2008	10

# Ergebnisse

**Tab. 3** Temperatur und Betriebsweise der geothermischen Anlage in Neuruppin während der Probennahmen

Herkunft der Probe	Probe	Datum	Temperatur zum Zeitpunkt der Beprobung [°C]
Förderbohrung	Fluid	03.09.2008	58
	Fluid	08.10.2008	59
	Fluid	21.11.2008	59
Injektionsbohrung	Tiefenprobe	12.06.2008	-
	Fluid	03.09.2008	53
	Fluid	08.10.2008	52
	Fluid	21.11.2008	45
Filtertöpfe	Feinfilter	21.02.2008	-
	Grobfilter	03.09.2008	-
	Feinfilter	03.09.2008	-
	Feinfilter	21.11.2008	-

## Probenaufbereitung und DNA Extraktion

Je ein Liter Fluid wurde durch Vakuumfiltration mit 0,22 µm Celluloseacetat Filtern (Sartorius, Germany) aufkonzentriert und bei -80 °C bis zur DNA-Extraktion gelagert. Die Proben aus den Filtersäcken der Filtereinheiten wurden ebenfalls bis zur Analyse bei -80 °C gelagert. Für die DNA-Extraktion wurden die Celluloseacetatfilter und Filtersäcke mit einem sterilen Skalpell in etwa 3x3 mm große Stücke geschnitten und anschließend mit dem MoBio Ultra Clean Soil Kit (Carlsbad, USA) entsprechend den Herstellerangaben extrahiert.

## SSCP Fingerprint-Analyse PCR amplifizierter 16S rRNA Gene

Für die SSCP Analysen wurden aus der extrahierten Gesamt-DNA Teilsequenzen der bakteriellen 16S rRNA Gene durch PCR amplifiziert. Dafür wurde das universelle Primerset com1/com2-ph verwendet (Schwieger & Tebbe 1998). Die PCR Reaktionen wurden mit einem Primus 25 Thermocycler (Peqlab, Erlangen, Germany) unter folgenden Bedingungen durchgeführt: einleitende Denaturierung bei 95 °C für 5 min; 35 Zyklen mit je 30 sec Denaturierung bei 94 °C, Primerbindung bei 55 °C für 30 sec, Elongation für 50 sec bei 70 °C; finale Elongation bei 70 °C für 3 min. Die PCR-Reaktionen wurden in einem Volumen von 100 µl folgender Zusammensetzung durchgeführt: 10 µl unverdünnter Template-DNA, 0,2 mM dNTP (Promega, Mannheim, Deutschland), 0,5 µM primer (MWG Eurofins, Ebersberg, Deutschland) und 2,5 U Taq Polymerase (Qiagen, Hilden, Deutschland) mit entsprechendem Puffer mit 1,5 mM MgCl<sub>2</sub> (Qiagen). Der Einzelstrangverdau und die

## Ergebnisse

---

Auftrennung der etwa 400 Basen großen PCR Produkte im SSCP Gel wurde nach Dohrmann & Tebbe (2005) durchgeführt und mit einer Silberfärbung visualisiert (Bassam et al. 1991). Dominante Banden wurden ausgeschnitten, reamplifiziert und anschließend sequenziert. Die Analysen wurden von AMODIA Bioservice GmbH, Braunschweig durchgeführt. Die aus der DNA Sequenzierung erhaltenen Nukleotidsequenzen wurden mit der Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) Funktion der NCBI Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) verglichen. Die in dieser Studie analysierten Sequenzen sind in der EMBL Datenbank des europäischen Bioinformatik Instituts ([www.ebi.ac.uk/embl](http://www.ebi.ac.uk/embl)) unter den Nummern GU722519-GU722572 hinterlegt.

### **Mineralogische und geochemische Analysen**

Die Beläge in den Filtern der obertägigen Anlagen wurden mit einem Rasterelektronenmikroskop (Cambridge S200) mit energiedispersiver Röntgenspektroskopie (REM-EDX) auf ihre mineralogische Zusammensetzung untersucht. Der Gesamtgehalt an organischem Kohlenstoff (TOC) im Sediment der Tiefenprobe wurde mit einem TOC-Analysator (Dimatec GmbH) nach DIN-EN 1484-H3 bestimmt. Die Konzentration an kurzkettigen organischen Säuren (z.B. Acetat) im Fluid wurde mittels Ionenchromatographie (ICS 3000, Dionex Corp.) ermittelt. Das Redoxpotential und der pH-Wert wurden während der Probennahme mit einem pH/mV/Temperatur-Handgerät bestimmt (WTW). Der Sulfat- und Eisengehalt wurden mittels Massenspektroskopie mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-MS) nach DIN EN ISO 17294-2 bzw. mittels Ionenchromatographie nach DIN EN ISO 10304-2 analysiert.

### **3.1.5. Ergebnisse und Diskussion**

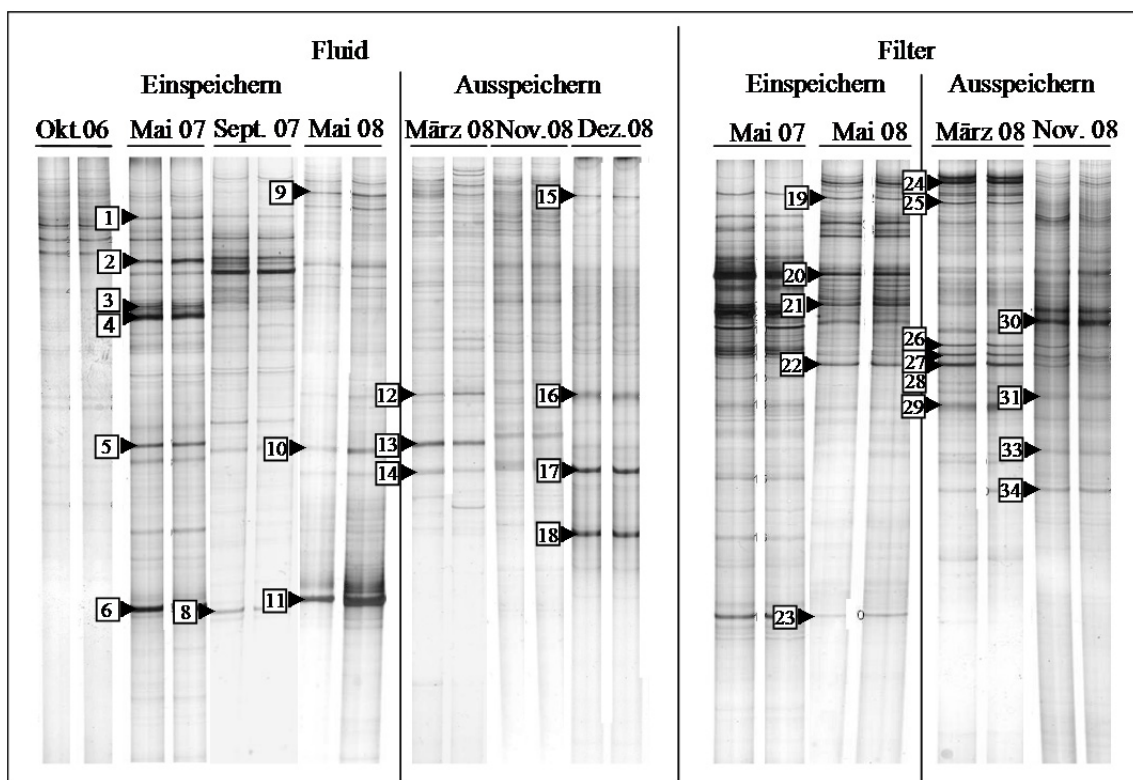
Im Rahmen dieser Studie wurde die mikrobielle Diversität in Fluid- und Filterproben von zwei geothermischen Anlagen im Norddeutschen Becken über einen Zeitraum von 9 bzw. 26 Monaten untersucht. Im Mittelpunkt der Untersuchungen stand die Charakterisierung der mikrobiellen Biozönose, die Erfassung von qualitativen Veränderungen in Abhängigkeit von der anthropogenen Nutzung der Aquifere und die Ableitung der im Untergrund

# Ergebnisse

dominierenden Stoffwechselprozesse, um zu prüfen, ob die mikrobielle Stoffwechselaktivität die Betriebssicherheit der geothermischen Anlagen beeinträchtigen kann.

## Mikrobielle Diversität im Solar-Wärmespeicher Rostock (Helios)

Mit PCR-SSCP Analysen wurden mikrobielle Biozönosen in allen Fluid- und Filterproben nachgewiesen. Die SSCP Profile umfassten bis zu 25 dominante Banden, die sich teils in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Probenahme in ihrem Auftreten und ihrer Intensität unterschieden (Abb. 2).



**Abb. 2** PCR-SSCP Profile der bakteriellen Biozönose in Fluiden und Filtern während des Ein- und Ausspeichermodus im Solar-Wärmespeicher Rostock. Die Pfeile kennzeichnen die sequenzierten Banden. Die Banden der Probe vom Oktober 2006 konnten nicht reamplifiziert und damit auch nicht sequenziert werden.

Unterschiede in der Bandenintensität wurden vor allem zwischen Fluid- und Filterproben eines Probenahme-Zeitpunktes deutlich. Die Unterschiede der mikrobiellen Biozönose auf Filtern im Ausspeicher- und Einspeichermodus waren hingegen geringer. Die Profile der

## Ergebnisse

---

Filtersäcke während eines Modus unterschieden sich überwiegend in der Intensität der Banden, weniger in der Bandenverteilung. Demgegenüber variierten die Profile der Fluidproben aus der Einspeicherphase im zeitlichen Verlauf stark. Eine besonders auffällige Änderung der Biozönose ist zwischen den Proben vom Oktober 2006 und Mai 2007 festzustellen. Diese ist wahrscheinlich auf einen Ausfall der Pumpe auf der warmen Seite des Aquifers im November 2006 zurückzuführen, bei dem Öl in die Bohrung gelangte, so dass die Anlage bis November 2007 nur im Einspeichermodus betrieben werden konnte.

Die Profile der Filterproben zeigen intensivere Banden als die Profile der Fluidproben. Dies weist auf einen höheren Biomassegehalt in den Filtern hin. Ursache dafür ist, dass Mikroorganismen, die an Gesteinsoberflächen im Aquifer oder in der Anlage anheften, während der Fluidförderung mitgerissen werden, sich im Filter akkumulieren und u.U. auch vermehren. Die resultierende Biofilmbildung begünstigt den Rückhalt von Nährstoffen und schafft damit günstige Wachstumsbedingungen (Wolfaardt et al. 1999).

Anhand der Sequenzierung dominanter Banden wurden in den Fluid- und Filterproben während des Ein- und Ausspeicherbetriebes Mikroorganismen aus den Klassen Beta-, Delta-, Epsilon- und Gamma-*Proteobacteria*, sowie *Verrucomicrobia*, *Clostridia*, *Chloroflexi* und *Chlorobi* nachgewiesen (Tab. 4).

Die nachgewiesenen DNA-Sequenzen hatten 88 bis 100 % Ähnlichkeit zu Sequenzen der Gendatenbank, die aus anoxischen Böden, marinen Sedimenten des Wattenmeeres sowie aus Frisch- und Grundwasserhabitaten isoliert wurden (Peduzzi et al. 2003, Wilms et al. 2005, Newton et al. 2006, Briée et al. 2007, Hori et al. 2007, Johnston et al. 2007, Li et al. 2009, Mueller-Spitz et al. 2009). Die Hälfte der DNA Sequenzen wurde bisher unkultivierten, in Physiologie und Metabolismus unbeschriebenen Spezies zugeordnet. Etwa ein Drittel der Sequenzen weisen weniger als 95% Ähnlichkeit zu in der Gendatenbank hinterlegten Sequenzen auf und können daher keiner Gattung zugeordnet werden. Rückschlüsse auf die katalysierten Stoffwechselprozesse sind daher kaum möglich. Insgesamt zeigen die Ergebnisse der nachgewiesenen Phyla eine für ein oberflächennahes Grundwasser typische Biozönose, die in Abhängigkeit von der Betriebsweise der Anlage Unterschiede in der Zusammensetzung der *Proteobacteria* aufwies.

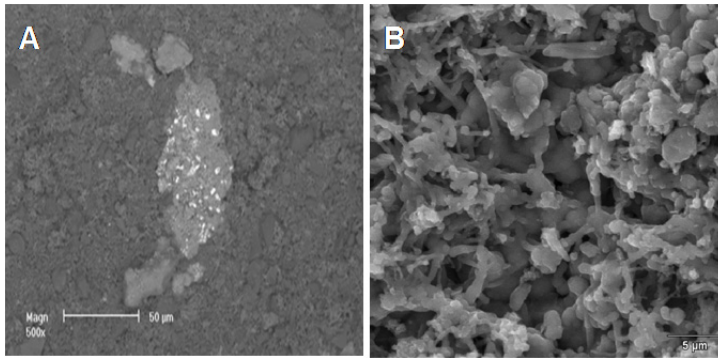
## Ergebnisse

**Tab. 4** Phylogenetische Zuordnung partieller bakterieller 16S rRNA-Gensequenzen aus den SSCP-Profilen von Fluid- und Filterproben des Solar-Wärmespeichers in Rostock

Probe	Klasse	Unterklasse	Bande	Nächster Verwandter in Datenbank (BLAST)	Ähnlichkeit [%]	GenBank accession number
Fluid	<i>Proteobacteria</i>	Beta-	1	uncultured bacterium, clone UH-52	98	GU722519
			3	uncultured bacterium, clone 080624-Aspo-Fracture-Biofilm-G12-4	97	GU722521
			5	uncultured bacterium, clone H2SRC120	98	GU722523
			14	uncultured bacterium, clone 0F8	97	GU722531
		Delta-	2	uncultured <i>Desulfobacterales</i> bacterium, clone DCC2	98	GU722520
			9	uncultured bacterium, clone VERDEA26	92	GU722526
			15	uncultured <i>Geobacteraceae</i> bacterium, clone M16_1091	94	GU722532
			16	<i>Desulfocapsa</i> sp. Cad626	97	GU722533
			17	uncultured <i>Desulfobulbus</i> sp.	89	GU722534
			18	uncultured <i>Desulfobulbus</i> sp.	91	GU722535
		Epsilon-	6	uncultured bacterium, clone JMYB12-57	97	GU722524
			8	uncultured bacterium, clone JMYB12-57	97	GU722525
			11	<i>Sulfuricurvum</i> sp. enrichment culture, clone D2CL_Bac_16S_Clone8	99	GU722528
		Gamma-	4	uncultured bacterium, clone 3342O30e	96	GU722522
<i>Verrucomicrobia</i>	10	uncultured bacterium, clone MVP-26	95	GU722527		
	13	uncultured <i>Verrucomicrobia</i> bacterium, clone MVP-26	97	GU722530		
<i>Clostridia</i>	12	uncultured <i>Thermoanaerobacteriaceae</i> bacterium, clone D15_17	91	GU722529		
Filter	<i>Proteobacteria</i>	Beta-	19	uncultured bacterium, clone UH-52	98	GU722536
			20	uncultured bacterium, clone TA3_31	96	GU722537
			24	<i>Comamonas</i> sp., OS-14	98	GU722541
		Delta-	21	uncultured bacterium, clone 1R1U71	98	GU722538
			25	uncultured bacterium, clone 1R1U71	93	GU722542
			29	<i>Desulfocapsa</i> sp., Cad626	98	GU722546
			31	<i>Desulfocapsa</i> sp., Cad626	88	GU722548
		Epsilon-	23	<i>Sulfuricurvum kujiense</i> , strain YK-4	100	GU722540
		<i>Chloroflexi</i>	22	uncultured bacterium, clone C25	94	GU722539
			26	uncultured bacterium, clone C25	97	GU722543
			27	uncultured bacterium, clone C25	98	GU722544
			28	uncultured bacterium, clone C25	98	GU722545
		<i>Chlorobi</i>	30	<i>Chlorobi</i> bacterium Mat9-16	96	GU722547
		<i>Clostridia</i>	34	uncultured <i>Clostridiaceae</i> bacterium, clone B-LO-T0_OTU17	96	GU722550

Die den Delta-*Proteobacteria* zugeordneten Sequenzen der Banden 2 und 16-18 gehören zu Sulfatreduzierenden Bakterien (SRB) der Ordnung *Desulfobacterales* (Gattung *Desulfocapsa*, *Desulfobulbus*) und wurden, unabhängig von der Betriebsweise, in Fluid- und Filterproben nachgewiesen (Abb. 2). Der Temperaturbereich der in der Literatur beschriebenen Spezies liegt mit 10 bis 40 °C im mesophilen Bereich und entspricht somit den Aquiferbedingungen (Widdel & Pfennig 1982, Samain et al. 1984, Janssen et al. 1996, Finster et al. 1998, Lien et al. 1998, Sass et al. 2002, Suzuki et al. 2007). Eisensulfid-Ausfällungen, die im Filter durch Rasterelektronenmikroskopie nachgewiesen wurden (Abb. 4A), sind wahrscheinlich die Stoffwechselprodukte der Sulfatreduzierer.

## Ergebnisse



**Abb. 3** Mineralische Ablagerungen (Scales) aus dem Wärmespeicher Rostock: REM-EDX Detailaufnahme von Eisensulfiden (A) und der Oberfläche einer Eisenhydroxidkruste (B).

Neben SRB wurden auch Schwefel oxidierende Epsilon-*Proteobacteria* (*Sulfuricurvum kujiense*) regelmäßig in Fluid- und Filterproben während des Einspeicherns nachgewiesen (Abb. 2, Bande 6, 8, 11, 23). Physiologische Studien von Kodama und Watanabe (2004) an *S. kujiense* zeigten für Temperaturen von 10 bis 35 °C zelluläres Wachstum. Trotz der geringen Temperaturunterschiede zwischen der kalten und warmen Aquiferseite sind vermutlich aufgrund des Spezies abhängigen Temperaturoptimums *S. kujiense* Sequenzen nur auf der kalten Aquiferseite, d.h. während des Einspeicherns zu finden. Unterstützt wird diese Annahme durch unterschiedliche Bandenintensitäten in den Profilen der Fluide. So ist die *S. kujiense* Bande 8 im Profil vom September 2007 (Fluidtemperatur 18 °C) schwächer, als die *S. kujiense* Banden 6 und 11 der Profile Mai 2007 und Mai 2008 (Fluidtemperatur 12 °C bzw. 10 °C). Vermutlich sind einzelne Spezies der mikrobiellen Biozönose nur in einem engem Temperaturbereich in ihrem Wachstum begünstigt. Zudem können bei einer Temperaturänderung Konkurrenzbeziehungen zu anderen Organismen eine Rolle spielen. *S. kujiense* sind fakultativ anaerobe Schwefeloxidierer, chemolithoautotroph und wurden auch in einem unterirdischen Erdöl Reservoir und in schwefelhaltigen Quellen in Höhlen detektiert (Engel et al. 2003, Kodama & Watanabe 2004). Trotz der weiten Verbreitung von Epsilon-*Proteobacteria* in natürlichen schwefelhaltigen Habitaten, wie hydrothermalen Sedimenten (Reysenbach et al. 2000, López-García et al. 2003, Nakagawa et al. 2005), Erdöllagern (Gevertz et al. 2000, Kodama et al. 2007), Grundwässern, Höhlen und Quellen (Macalady et al. 2008, Porter & Engel 2008) ist die ökologische Bedeutung dieser Organismengruppe noch wenig erforscht, was mit der bisher geringen Zahl an kultivierten Spezies in diesem phylogenetischen Zweig der Domäne der Bacteria zusammenhängt.



## Ergebnisse

---

Einen ebenfalls oxidativen Prozess katalysieren die in Filterproben (März 08) nachgewiesenen Vertreter aus der Gattung *Comamonas* (Abb. 2, Bande 24). Dieser Nitrat-abhängige Eisenoxidierer begünstigt die Bildung von schwer löslichen Eisenhydroxiden. Entsprechende Ausfällungen konnten durch rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen in den Filtern nachgewiesen werden (Abb. 4B). Eine abiotische Bildung von Eisenhydroxiden durch Sauerstoff ist durch eine Stickstoffbeaufschlagung in den Bohrungen auszuschließen (Hoffmann et al. 2008). Produkte aus der Eisenoxidation können wiederum von Eisen reduzierenden Organismen, wie den in der Fluidprobe vom Dezember 2008 nachgewiesenen *Geobacteraceae* (Abb. 2, Bande 15) als Elektronenakzeptor genutzt. Dieser Metabolismus spielt in Böden und Sedimenten für das Energie- und Nährstoffrecycling eine wichtige Rolle (Blöthe & Roden 2009, Straub et al. 2001, Roden et al. 2004, Weber et al. 2006). Das im Fluid bestimmte Redoxpotential von 90 bis 143 mV entspricht dabei den Bedingungen beginnender Eisenreduktion. In Biofilmen an Oberflächen und in den untersuchten Filterproben ist jedoch von anderen Redoxverhältnissen auszugehen, unter denen auch weitere Stoffwechselreaktionen möglich sind.

Neben unterschiedlichen *Proteobacteria* wurden auch Vertreter von *Chloroflexi* und *Chlorobi* in den Fluid- und Filterproben nachgewiesen. Hierbei wird erneut der Akkumulierungseffekt von Zellen in den Filtern deutlich, da die entsprechenden Banden in den Profilen der Filter intensiver sind. Auch wenn die Ökologie der nachgewiesenen phototrophen Bakterien, die gewöhnlich mikrobielle Matten in anoxischen Seesedimenten bilden und stoffwechselphysiologisch auf Licht angewiesen sind, in dem untersuchten Aquifer unklar ist, gelangten diese Organismen vermutlich durch infiltrierende Oberflächenwässer in den vergleichsweise oberflächennah gelegenen Aquifer. Studien von Bork et al. (2009) zeigten ebenfalls, dass die hydrogeologische Interaktion von Grundwasser und Oberflächenwasser die Fauna des Grundwassers beeinflusst. Die geochemische Charakterisierung des Fluids weist auch auf den Einfluss obertägiger Prozesse auf den untersuchten Aquifer hin (Vetter et al. 2011). Die Isotopensignatur des DOC ( $\delta^{13}\text{C}_{\text{DOC}}$ ) lag bei durchschnittlich -27,2 ‰ und bestand überwiegend aus Huminstoffen. Im Allgemeinen deuten Huminstoffe mit  $\delta^{13}\text{C}$  Werten von -24 ‰ und -28 ‰ auf terrestrische Pflanzen hin, die über den Calvin-Cyclus Kohlenstoff in Form von  $\text{CO}_2$  binden (Spalding et al. 1978). Vertreter des Phylums *Chloroflexi* wurden bereits in geothermalen Böden und heißen Quellen (Stott et al. 2008, Lau et al. 2009) sowie



## Ergebnisse

---

Frischwässern (Kojima et al. 2006, Briée et al. 2007) nachgewiesen. Die wenigen bisher kultivierten thermophilen Vertreter sind organotroph oder reduzieren chlorierte Kohlenwasserstoffe (Morris et al. 2004).

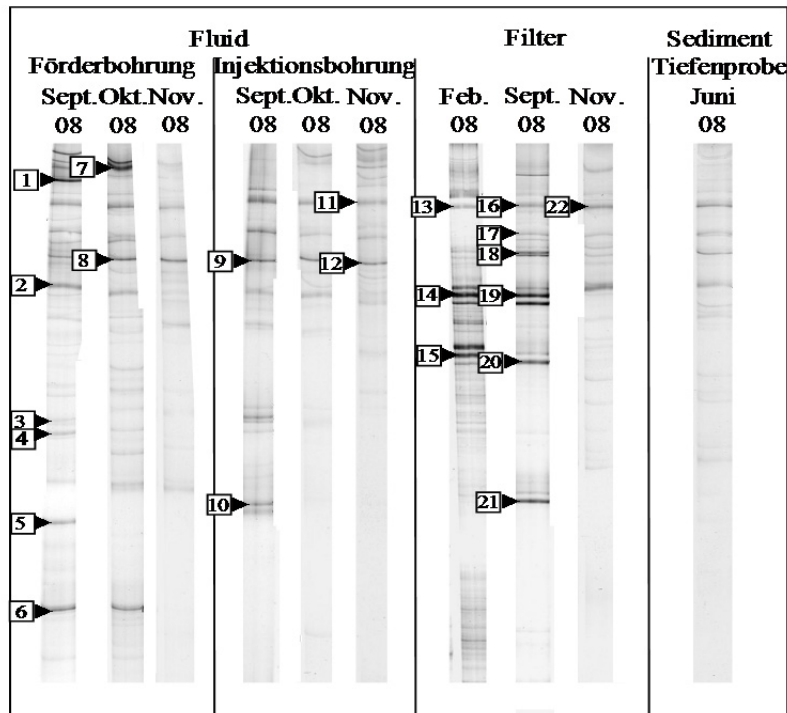
Sowohl der Wechsel von Einspeicherung und Ausspeicherung, als auch infiltrierende Oberflächenwässer beeinflussten möglicherweise die beobachteten saisonalen Schwankungen in der mikrobiellen Biozönose des Fluids. Der Einfluss von versickerndem Oberflächenwasser auf einen oberflächennahen Aquifer wurde ebenfalls von Briemann et al. (2009) beobachtet. Die simultane Präsenz von Organismen der Erdoberfläche sowie von unkultivierten Spezies aus dem Untergrund verdeutlicht ein charakteristisches mikrobielles Ökosystem in erdgeschichtlich relativ jungen Sedimenten des Untergrundes.

### **Mikrobielle Diversität in der geothermischen Anlage in Neuruppin (Seetorviertel)**

In allen Fluidproben der Produktions- und Injektionsbohrung sowie Filterproben der obertägigen Anlage wurden mikrobielle Biozönosen nachgewiesen. Die SSCP Profile umfassten bis zu 19 dominante Banden, deren Vorkommen und Intensität bei den Fluidproben der Förder- und Injektionsbohrung sowie den untersuchten Zeitpunkten eine weitgehende Übereinstimmung aufwiesen (Abb. 3).

Die DNA Sequenzen der dominanten SSCP Banden wurden bekannten Alpha-, Beta- und Gamma-*Proteobacteria* sowie *Clostridia* und *Bacteroidetes* zugeordnet und wiesen Ähnlichkeiten von 90 bis 99% zu in der Datenbank hinterlegten Sequenzen auf, die in Schwermetall kontaminierten Böden, Ölreservoirs und salinen Sedimenten nachgewiesen wurden (Daffonchio et al. 2006, Kjeldsen et al. 2007, Sette et al. 2007) (Tab. 5).

# Ergebnisse



**Abb. 4** PCR-SSCP Profile der bakteriellen Biozönose in Fluiden der Förder- und Injektionsbohrung, den Filtern und dem Sediment einer Tiefenprobe aus der geothermischen Anlage in Neuruppin. Die Pfeile kennzeichnen die sequenzierten Banden.

**Tab. 5** Phylogenetische Zuordnung partieller bakterieller 16S rRNA-Gensequenzen aus den SSCP-Profilen von Fluid- und Filterproben der geothermischen Anlage in Neuruppin

Klasse	Unterklasse	Bande	Nächster Verwandter in Datenbank (BLAST)	Ähnlichkeit [%]	GenBank accession number
<i>Proteobacteria</i>	Alpha-	4	<i>Methylobacterium</i> sp. PB20	96	GU722554
		5	<i>Sphingomonas</i> sp. F1406	99	GU722555
		10	<i>Sphingomonas</i> sp. F1406	99	GU722560
		21	<i>Sphingomonas</i> sp. F1406	99	GU722571
	Beta-	1	<i>Comamonas</i> sp. SP1	97	GU722551
		7	<i>Diaphorobacter</i> sp. J5-51	99	GU722557
		8	<i>Ralstonia</i> sp. 12D	99	GU722558
		9	<i>Ralstonia</i> sp. 12D	99	GU722559
		12	<i>Ralstonia</i> sp. 12D	99	GU722562
		18	<i>Ralstonia</i> sp. 12D	99	GU722568
	Gamma-	3	<i>Moraxella osloensis</i> , strain PCWCW3	95	GU722553
		11	<i>Pseudomonas fluorescens</i> , strain CTS193	99	GU722561
		16	<i>Pseudomonas fluorescens</i> , strain CTS193	99	GU722566
13		<i>Pseudomonas</i> sp., strain DIV099	98	GU722563	
17		<i>Pantoea</i> sp. N3	96	GU722567	
		22	<i>Pseudomonas</i> sp., clone C5	98	GU722572
<i>Clostridia</i>		2	<i>Desulfotomaculum</i> sp., strain NA401	90	GU722552
		14	<i>Halanaerobium</i> sp., strain S191	99	GU722564
		15	<i>Halanaerobium</i> sp., strain AN-B15B	92	GU722565
		19	uncultured <i>Halanaerobium</i> sp.	98	GU722569
		20	uncultured <i>Halanaerobium</i> sp.	98	GU722570
<i>Bacteroidetes</i>		6	uncultured <i>Bacteroidetes</i> bacterium, clone Cf2-37	96	GU722556

## Ergebnisse

---

Die identifizierten Sequenzen konnten sowohl obligat anaeroben, halophilen (z.B. *Halanaerobium* sp. (Banden 14, 15, 19, 20), *Bacteroidetes* sp. (Bande 6)) als auch fakultativ anaeroben (z.B. *Sphingomonas* sp. (Banden 5, 10, 21), *Pseudomonas* sp. (Banden 11, 13, 16, 22)) und obligat aeroben (z.B. *Methylobacterium* sp. (Bande 4)) Organismen zugeordnet werden und spiegeln somit suboxische Bedingungen wider. *Halanaerobium* wurde nur in den Filterproben nachgewiesen, hingegen wurden *Proteobacteria*-Sequenzen sowohl in den Filterproben als auch in den Fluiden der Förder- und der Injektionsbohrung detektiert. Ursache dafür sind vermutlich Akkumulierungseffekte in den Filtern. *Bacteroidetes* wurden nur im Fluid der Förderbohrung nachgewiesen.

Die identifizierten Organismen sind neben einem chemoorganotrophen und teils fermentativen Stoffwechsel (*Clostridia* (Bande 2, 14, 15, 19, 20), *Bacteroidetes* (Bande 6)) zur Sulfatreduktion (*Desulfotomaculum* sp., (Bande 2)) und Eisenoxidation (*Comamonas* sp., (Bande 1)) fähig. Zahlreiche Arten der Gattungen *Sphingomonas*, *Pseudomonas* und *Pantoea* sind in der Lage EPS, die Grundsubstanz von Biofilmen, zu produzieren. Neben *Halanaerobium* Sequenzen, die zu 98 % Sequenzen aus Ölreservoirs des Brasilianischen Beckens ähneln (Sette et al. 2007), kommt Vertretern der identifizierten Gattungen *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Moraxella*, *Pantoea*, *Diaphorobacter* eine Bedeutung beim Abbau von chemischen Kontaminationen, wie Kohlenwasserstoffverbindungen, in Grundwassersystemen und Sedimenten zu (Stapleton et al. 2000, Shi et al. 2001, Belhaj et al. 2002, Konstantinidis et al. 2003, Röling et al. 2004, Jain et al. 2005, Hamamura et al. 2006). Da bei einer Tiefenbeprobung der Injektionsbohrung ein TOC-reiches Sediment (TOC 15 %) gefördert wurde und auch organischen Kohlenstoff abbauende Mikroorganismen (*Clostridia*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria*) nachgewiesen wurden, ist anzunehmen, dass sich im bohrlochnahen Bereich mehr verwertbare Kohlenstoffverbindungen für Mikroorganismen befanden als im Schichtwasser, in dem 0,076 mg l<sup>-1</sup> Kohlenwasserstoffe nachgewiesen wurden (Wolfgramm et al. 2007). Des Weiteren weisen, vier Monate nach Inbetriebnahme der Anlage, im Fluid der Injektionsbohrung gemessene hohe DOC-Werte von 7,9 mg C l<sup>-1</sup> auf vorhandene Kohlenstoffverbindungen hin. Ein Eintrag von Kohlenwasserstoffverbindungen in den Aquifer kann über Spülzusätze sowie Schmier- und Gestängefette, während des Abteufens der Bohrungen und der Installation der obertägigen Anlage erfolgt sein. Hauptbestandteile der eingesetzten Bohrspülung waren Bentonit (Tonminerale), Soda

## Ergebnisse

---

( $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$ ) und Carboxy-Methyl-Cellulose (CMC). In Folge hat so eine Selektion der Biozönose in Richtung heterotropher Organismen stattgefunden.

### 3.1.6. Zusammenfassende Bewertung

Im Rahmen dieser Studie wurden in den Prozesswässern und dem Filtermaterial geothermischer Anlagen des Norddeutschen Beckens trotz teils hoher Salzfracht und Temperatur vielfältige mikrobielle Biozönosen nachgewiesen. Waren im oberflächennahen Aquifer des Rostocker Solar-Wärmespeicher vor allem Beta-, Delta-, Epsilon-, Gamma-*Proteobacteria*, *Verrucomicrobia*, *Clostridia*, *Chloroflexi* und *Chlorobi* über genetisches Fingerprinting nachweisbar, so dominierten im salinen, tiefen Aquifer der geothermischen Anlage Neuruppin mit Temperaturen bis zu 63 °C Alpha-, Beta-, Gamma-*Proteobacteria*, *Clostridia* und *Bacteroidetes*. In beiden Aquiferen wurde die mikrobielle Zusammensetzung im Fluid vermutlich durch externe Faktoren beeinflusst, wie dem Wechsel der Förderrichtung und infiltrierende Oberflächenwässer in Rostock oder organische Rückstände aus dem Anlagenbau in Neuruppin.

Die Biozönose im oberflächennahen Aquifer ist charakteristisch für Grundwasser- und Sedimenthabitate, die durch niedrige DOC-Gehalte gekennzeichnet sind. Folglich zeichnen sich die nachgewiesenen Bakterien durch einen von organischer Substanz unabhängigen, chemolithoautophen, als auch auf organischem Material basierenden, chemoorganotrophen Stoffwechsel aus. Dem gegenüber waren die im salinen, in 1.700 m tief gelegenen Aquifer nachgewiesenen Organismen überwiegend chemoorganotroph, teils fermentativ. DOC-Gehalte im Fluid von bis zu 7,9 mg C l<sup>-1</sup> sowie TOC-reiches Sediment aus der Injektionsbohrung weisen auf einem möglichen Eintrag von organischem Kohlenstoff während Erstellung der Bohrungen hin.

Bei dem oberflächennah gelegenen Solar-Wärmespeicher wurde durch den Nachweis phototropher Mikroorganismen, Geochemie des Fluides und im DOC dominierende Huminstoffe der Einfluss von Infiltrationswässern deutlich.

Trotz unterschiedlich hoher Sulfatkonzentrationen im Fluid wurden in beiden Aquiferen Sulfatreduzierer unterschiedlicher Gattungen nachgewiesen (*Desulfobulbus* sp., *Desulfocapsa* sp., *Desulfotomaculum* sp.). Sulfatreduzierer sind in unterirdischen Habitaten weit verbreitet und zahlreiche Studien belegen im Besonderen eine Beteiligung bei Ausfällungsprozessen

## Ergebnisse

---

und Biokorrosion an metallischen Oberflächen (Baas Becking & Moore 1961, Beech & Sanner 2004, Little & Lee 2007, Muyzer & Stams 2008). Ursache ist der von Sulfatreduzieren produzierte Schwefelwasserstoff, der im Reservoir oder der obertägigen Anlage zusammen mit anorganischen Materialien, wie z.B. Eisen aus dem strömenden Medium ausfallen und den Feststoffanteil in den Anlagen oder der Bohrung erhöhen kann. Entsprechende Eisensulfide wurden in beiden geothermischen Anlagen in den Filterbereichen nachgewiesen. Durch den Nachweis dieser wahrscheinlich durch mikrobiellen Stoffwechsel in den Filtern gebildeten Feststoffe ist von einem stoffwechselaktiven Biofilm und nicht allein von einer mechanischen Akkumulierung von Zellen durch den Fluidtransport auszugehen. Neben sulfidischen Ausfällungen spielen die durch Eisenoxidierer produzierte Eisenhydroxide in den Filtern des Wärmespeichers eine wichtige Rolle. Mineralische Ausfällungen in den Filtern der obertägigen Anlage können den für die Re-Injektion notwendigen Druck soweit erhöhen, dass ein Filterwechsel erforderlich wird. Bei einem massiven Feststoffanfall über den Filtrationsbereich hinaus, kann die Injektivität der Bohrung beeinträchtigt werden. Im Untersuchungszeitraum kam es jedoch bei den hier untersuchten geothermischen Anlagen zu keinem Anstieg des Kopfdruckes an den Injektionsbohrungen in Folge mikrobiell verursachter Ausfällungen und folglich reduzierter Injektivität. Dennoch sollte v.a. die Gruppe der Sulfatreduzierer bei der Beurteilung mikrobieller Prozesse in geothermischen Anlagen langfristig im Detail untersucht werden, da sie den Betrieb einer geothermischen Anlage stören können. Gestützt werden diese Empfehlungen durch Erkenntnisse aus Ölreservoirs, wo mikrobiell induzierte Korrosion und Reservoirversäuerung durch SRB einen entscheidenden ökonomischen Stellenwert haben (Antipov & Levashova 2002, Eckford & Fedorak 2002, Orphan et al. 2000, Slobodkin et al. 1999, Watanabe et al. 2001).

Die im Rahmen dieser Studie gewonnenen Ergebnisse zeigen an die jeweiligen Aquiferbedingungen angepasste Biozöosen, die zu Wachstum und Vermehrung fähig sind, da sich Mikroorganismen zusammen mit ihren Stoffwechselprodukten kontinuierlich in Fluid- und Filterproben nachweisen lassen. Dabei deutet sich an, dass insbesondere Organismen des Schwefel- und Eisenkreislaufs die Nutzung geothermischer Aquifere negativ beeinflussen können.

## **Danksagung**

Die hier dargestellten Forschungsergebnisse wurden im Rahmen des Projektes „AquiScreen“ gewonnen, das durch das Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit (BMU) unter dem Förderkennzeichen 0327634 gefördert wurde. Wir danken an dieser Stelle für die finanzielle Unterstützung. Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt bei den Autoren. Wir danken Andrea Vieth-Hillebrand und Alexandra Vetter für die ergänzenden biogeochemischen Daten und die kritische Durchsicht des Manuskripts. Weiterhin danken wir Herrn Professor Sand sowie dem anonymen Reviewer für Ihre hilfreichen Anmerkungen.

### **3.2. Influence of microbial processes on the operation of a cold store in a shallow aquifer: impact on well injectivity and filter lifetime**

*Zweite Veröffentlichung: erschienen 2011 in Grundwasser 16:93-104*

**Autoren: Stephanie Lerm<sup>1</sup>, Mashal Alawi<sup>1</sup>, Rona Miethling-Graff<sup>1</sup>, Markus Wolfgramm<sup>2</sup>, Kerstin Rauppach<sup>2</sup>, Andrea Seibt<sup>3</sup>, Hilke Würdemann<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Helmholtz Centre Potsdam GFZ German Research Centre for Geosciences, International Centre for Geothermal Research ICGR, Telegrafenberg, D-14473 Potsdam, Germany

<sup>2</sup> Boden Wasser Gesundheit GbR. (BWG), D-17041 Neubrandenburg, Germany

<sup>3</sup> Geothermie Neubrandenburg (GTN), D-17041 Neubrandenburg, Germany

### 3.2.1. Abstract

In this study, the operation of a cold store, located in 30-60 m depth in the North German Basin, was investigated by direct counting of bacteria and genetic fingerprinting analysis. Quantification of microbes accounted for 1 to  $10 \times 10^5$  cells per ml fluid with minor differences in the microbial community composition between well and process fluids. The detected microorganisms belong to versatile phyla *Proteobacteria* and *Flavobacteria*. In addition to routine plant operation, a phase of plant malfunction caused by filter clogging was monitored. Increased abundance of sulphur-oxidizing bacteria indicated a change in the supply of electron acceptors; however, no changes in the availability of electron acceptors like nitrate or oxygen were detected. Sulphur- and iron-oxidizing bacteria played essential roles for the filter lifetimes at the topside facility and the injectivity of the wells due to the formation of biofilms and induced mineral precipitations. In particular, sulphur-oxidizing *Thiothrix* generated filamentous biofilms were involved in the filter clogging.

### 3.2.2. Kurzfassung

Im Rahmen dieser Studie wurde der Betrieb eines in 30-60 m Tiefe gelegenen Kältespeichers des Norddeutschen Beckens durch Bestimmung der Bakterien-Zellzahlen und genetischer Fingerprinting Analysen untersucht. Eine Zellzahlbestimmung ergab 1 bis  $10 \times 10^5$  Zellen pro ml Fluid, wobei geringe Unterschiede in der mikrobiellen Zusammensetzung zwischen Brunnenproben und Prozessfluiden nachgewiesen wurden. Die identifizierten Mikroorganismen wurden den Phyla *Proteobacteria* und *Flavobacteria* zugeordnet. Neben routinemäßigem Anlagenbetrieb wurde eine Phase mit technischen Störungen durch zugesetzte Filter dokumentiert. Die Zunahme an Schwefel-oxidierenden Bakterien zeigte eine erhöhte Verfügbarkeit von Elektronenakzeptoren an, obwohl keine Änderungen in der Verfügbarkeit von Elektronenakzeptoren, wie Nitrat oder Sauerstoff, nachgewiesen werden konnte. Schwefel- und Eisen-oxidierende Bakterien spielten durch die Bildung von Biofilmen und induzierter mineralischer Ausfällungen eine essentielle Rolle für die Filterstandzeiten in der obertägigen Anlage und die Injektivität der Bohrungen. Vor allem Schwefel-oxidierende *Thiothrix* bildeten filamentöse Biofilme und trugen wesentlich zum Zusetzen der Filter bei.



### 3.2.3. Introduction

Shallow aquifers are increasingly used for aquifer thermal energy storage (ATES), e.g. storage of winter's natural cold for several months by the installation of wells and corresponding topside facilities. This technology represents an environmentally friendly alternative to conventional greenhouse gas-emitting fossil fuel supplied systems for building heating and cooling. In Germany, three different regions, the North German Basin, the Upper Rhine Graben and the Molasse Basin provide suitable conditions, like high temperatures, productivities or covering layers, for geothermal applications. In the North German Basin, ATES in the near subsurface serves for air-conditioning in buildings or housing-complexes. For efficient utilization of this energy source, failure due to scaling, biofouling or corrosion must be avoided. These phenomena are documented for many water-bearing systems and microorganisms are often involved or even responsible for its formation (Honegger et al. 1989, Flemming 2002, Beech and Sunner 2004, Coetser and Cloete 2005, Little and Lee 2007, Valdez et al. 2009). Few studies have examined biological and chemical processes in geothermal power plants (Honegger et al. 1989, Inagaki et al. 1997, Takai and Horikoshi 1999).

Based on increasing technical accessibility of groundwater horizons and aseptic sampling techniques, developed in the late 1970s for the shallow and deep subsurface, several studies were conducted to characterize the diversity of indigenous microorganisms in aquifers in different geological formations (e.g. Dunlap et al. 1977, Phelps et al. 1989, Baker et al. 2000, Roden and Wetzel 2003, Goldscheider et al. 2006, Wilson et al. 2006, Bri e et al. 2007, Griebler and Lueders 2009, Brielmann et al. 2009, Pronk et al. 2009). As aquifers are heterogeneously structured, they represent a variety of habitats with different physical and chemical conditions, created by host rock types, fluid temperature, pH, and salinity (Griebler and Lueders 2009). The nature of each subsurface environment controls the type of microbial community that can develop and the rate at which it can grow. Microbes are either free floating (planktonic) in groundwater or attached to mineral grains and reservoir rock surface, partly via special cellular attachment structures, necessitating sampling of fluid and solid samples. It is assumed that the attached way of living is favourable for bacteria in aquatic sediment systems, poor in organic carbon and nutrients (Harvey et al. 1984, Alfreider et al. 1997, Griebler et al. 2002). Microbes attached to surfaces form structured biofilms holding

## Ergebnisse

---

together by secreted slimy adhesive substances, termed extracellular polymeric substances (EPS) (e.g. Costerton et al. 1995, van Lossdrecht et al. 1995, Flemming et al. 2007). Due to internal zones of varying nutrients and physical conditions biofilms often contain different types of metabolically interacting organisms (synergism) and build complex biochemical networks that are balanced for an efficient exploitation of resources in the chemical energy depleted ecosystem. Parts of the biofilm may be dispersed either by cell division processes, due to nutrient levels or quorum sensing, or shearing because of flow effects (Hall-Stoodley et al. 2004). These detached parts are passively transported as suspended particles with the flow and are the basis for further microbial settlement processes to surfaces, e.g. at inside walls of geothermal plant casing.

In general, groundwater aquifers are depleted in easy available organic energy sources due to degradation processes in the upper subsurface (Gibert 1994, Chapelle 2001). Aquifer microorganisms gain their energy by two different pathways for growth and reproduction. The heterotrophic pathway bases on the complete and incomplete oxidation of organic carbon to carbon dioxide or simple organic molecules like organic acids or ethanol. Oxidizing agents are molecular oxygen or oxidized inorganic compounds, like nitrate and sulphate. However, lithoautotrophic organisms incorporate carbon dioxide and use inorganic compounds for energy generation.

For microbial analysis of the complex subsurface environment, different nucleic acid techniques based on 16S ribosomal ribonucleic acid (rRNA) genes are available and enable identification and classification of isolated 16S rRNA gene sequences without the limitation of time-consuming culturing methods (Amann et al. 1997). The submission of 16S rRNA sequences to the public database GenBank of the National Centre for Biotechnology Information (NCBI) comprising 16S rRNA sequences of up to 677,000 bacterial species allows a phylogenetic affiliation by similarity analyses as well as metabolic attribution from references in the database (Cole et al. 2009).

In this study, we present microbial monitoring of a shallow aquifer used for cold storage near the Berliner Reichstag (German Parliament). Genetic fingerprinting was used to characterize the microbial diversity in fluids of three wells reaching the aquifer as well as fluid and filter samples taken at the corresponding topside facility. In particular, our investigations focused

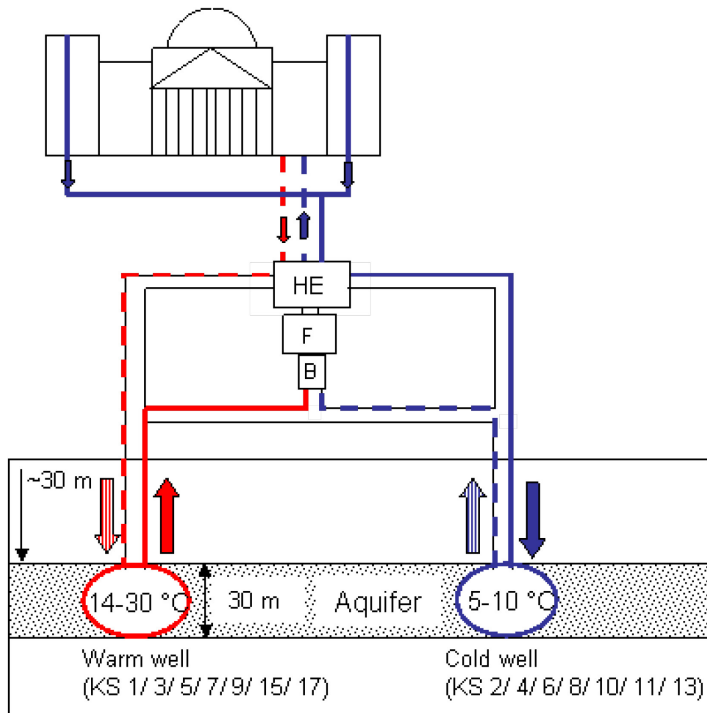
on the detection of dominant metabolic processes by following changes in microbial community structure in plant deriving fluid and filter samples that are caused by fluid recharge- and discharge processes over a period of 21 months. In addition, the total cell numbers in fluid samples were determined using epifluorescence microscopy with DAPI staining. DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) is a chemical agent that passes through an intact cell membrane and forms fluorescent complexes with natural double-stranded DNA. Thus, DAPI is used extensively in fluorescence microscopy. The microbiological results were correlated with results of chemical and mineralogical analyses to determine the dominant microbial processes at this cold store and the potential influence of microbes on plant operation.

### **3.2.4. Material and Methods**

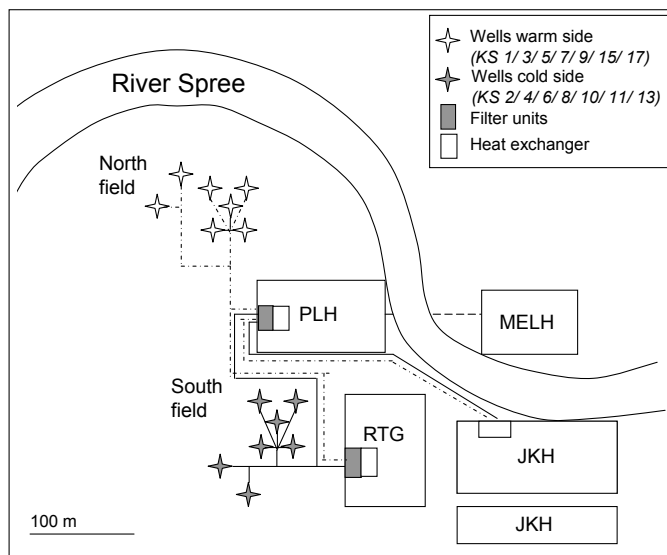
#### **Site description**

The aquifer is located in Quaternary sands at 30-60 m depth in the area of the Mittelbrandenburg plates and glacial valleys. It reaches the surface of the North German Basin and is characterized by the glacio-fluvial deposits of the last ice age (Fig. 1).

The aquifer is developed by wells and the associated underground infrastructure is connected with different buildings of the German Parliament through a complex pipeline system. The investigated ATES system is a seasonal cold store and has served as air-conditioning in the Reichstag since 2003 (Kabus and Seibt 2000, Sanner et al. 2005). Due to cold storage and fluid recharge and discharge processes the geothermal plant has a cold (south field) and warm (north field) side. Both sides are exploited by seven wells developing the aquifer (Fig. 2).



**Fig. 1.** Principle scheme of the cold store with the location of sampling devices for fluid (B, bypass) and filter (F) at the topside facility. For simplification only one well from the warm and the cold side and one building (Reichstag) that is connected to the topside facility are presented. The arrows indicate the fluid flow direction during recharge (winter, plain line) and discharge (summer, dashed line) mode. HE Heat exchanger.



**Fig. 2.** Schematic illustration of the cold store. PLH Paul Löbe Haus, RTG Reichstag, JKH Jakob Kaiser Haus, MELH Marie Elisabeth Lüders Haus.

## Ergebnisse

Dependent on the demand for cooling, certain wells from the cold and the warm side are connected and used as production- and injection-wells, respectively. In winter, fluid with 22 to 14 °C is pumped up from the warm side of the aquifer, cooled down to approximately 5 °C by cooling towers and reinjected in the cold side. In summer, fluid from the cold side is produced with temperatures ranging from 6 to 10 °C, providing the cooling of the buildings via heat exchanger. Afterwards, the warmed-up fluid is pumped back into the warm side of the aquifer with temperatures ranging between 15 and 30 °C. Because of the different flow directions the wells are equipped with pumps, production- and injection pipes. For retention of solid particles, transported with the production flow, filter systems are installed preceding the heat exchanger at the Reichstags building and the Paul Löbe Haus, each containing 8 and 16 filter bags, respectively. At the Reichstag building Eaton filter bags (LOFCLEAR-128-To2A-30l, pore size 25-40 µm) are used, whereas at Paul Löbe Haus Ama filter bags (AP50/25/10P2SS, pore size 10-50 µm) were used until autumn 2008. Since autumn 2008, Eaton filter bags were also used at Paul Löbe Haus. To prevent the intrusion of oxygen into the groundwater system the piping is under nitrogen pressure of about 0.4 to 0.9 bar.

The aquifer fluid is characterized as a shallow groundwater with a low salinity ( $< 1 \text{ g l}^{-1}$ ), a pH of 7.4 and redox potential of 40-80 mV (Tab. 1). The concentration of molecular oxygen is below the detection limit. Sulphate and dissolved organic carbon (DOC) -concentrations, both relevant for microbial processes, ranged between 164-221  $\text{mg l}^{-1}$  and 3.6-6.2  $\text{mg l}^{-1}$ , respectively. Nitrate was only rarely detected with 0.3  $\text{mg l}^{-1}$  on average (Opel et al. 2008). The concentration of the low weight molecular organic acids formate and acetate amounted to circa 0.1  $\text{mg l}^{-1}$  (Vetter et al. 2012).

**Tab. 1:** Operational and physico-chemical site characteristics

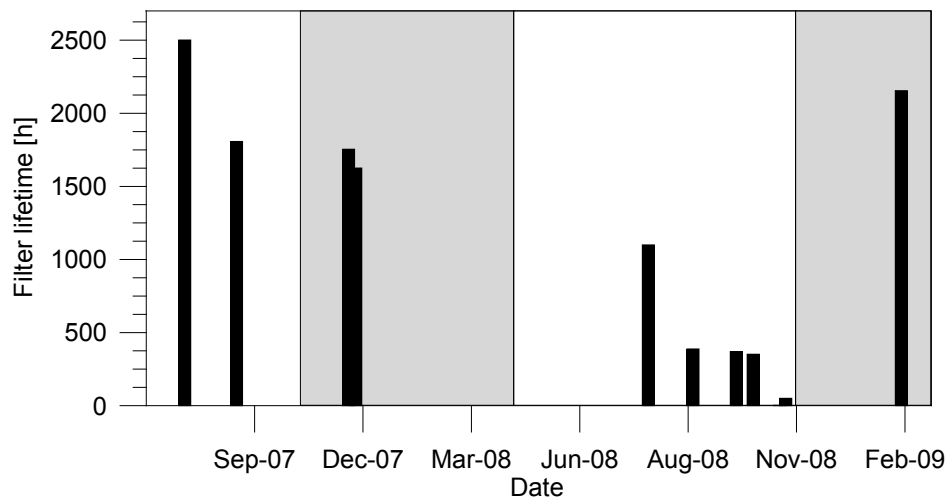
Reservoir rock	Complete start-up	Depth [m]	Temp. [°C]	Max. flow rate [ $\text{m}^3 \text{h}^{-1}$ ]	pH	Salinity [ $\text{g l}^{-1}$ ]	Redox potential SHE [mV]	DOC [ $\text{mg l}^{-1}$ ]	Sulphate [ $\text{mg l}^{-1}$ ]	Nitrate [ $\text{mg l}^{-1}$ ]	Ferrous iron [ $\text{mg l}^{-1}$ ]	Flow reversion
Sand	2003	30 - 60	6/30	300	7.4	$< 1$	40 - 80	3.6 - 6.2	164 - 221	1.3	2.1 - 2.4	March/ November

SHE standard hydrogen electrode, DOC dissolved organic carbon

# Ergebnisse

## Sampling and sample preparation

In the course of routine well regeneration, fluids deriving from the wells KS 3, KS 5, KS 7, developing the warm side of the aquifer (north field), were sampled once in 2006 using a manual downhole sample, that was disinfected with ethanol before use. In addition, fluid and filters were sampled at the topside facility in the Reichstag and the Paul Löbe Haus from the operating geothermal plant during the recharge and discharge mode once in June 2006 and in 2007 till 2009 over the course of 21 months, including a phase of decreased filter lifetimes at the topside facility in summer/autumn 2008 (Fig. 3, Tab. 2).



**Fig. 3.** Filter lifetimes at the topside facility before and after disinfection. grey (recharge mode), white (discharge mode)

Fluid was taken by a bypass system preceding the filter system at the topside facility and collected in sterile 1 litre Schott Duran glass bottles. The sampling equipment was purged before use with the produced fluid from which the sample was taken in order to minimize the risk of contamination. For genetic profiling, bacteria in fluids were concentrated by filtration on 0.22  $\mu\text{m}$  cellulose acetate filters (Sartorius, Goettingen, Germany) and stored at  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  until processed. Single filter bags taken from the filter systems were stored in autoclaved aluminium foil at  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  until processed.

# Ergebnisse

**Tab. 2:** Overview of fluid and filter samples

Date	Type	Sample origin	Operation Mode	Temperature <sub>out</sub> [°C]	Temperature <sub>in</sub> [°C]
June 2006	Fluid	wells	-	-	-
May 2007	Fluid	PLH	discharge	7.7	19.7
March 2008	Fluid	PLH	recharge	16.2	7.3
July 2008	Filter	PLH	discharge	8.9	23.7
August 2008	Fluid	PLH	discharge	10.3	15.9
September 2008	Fluid	PLH	discharge	10.4	15.4
October 2008	Fluid	RTG	discharge	9.9	14.5
November 2008	Filter	RTG	recharge	14.5	14.5
December 2008	Fluid	PLH	recharge	14.0	7.8
January 2009	Fluid	PLH	recharge	15.0	7.2
February 2009	Filter	PLH	recharge	13.8	6.2

wells (KS 3, KS 5, KS 7), PLH (Paul Löbe Haus), RTG (Reichstag)

## Total cell counts

For DAPI-staining, fluid samples taken at the topside facility were used. Fresh fluid samples were fixed with formaldehyde to a final formaldehyde concentration of 1 % for 4 h at 4 °C. To concentrate the cells, fluid volumes ranging from 1 to 30 ml were filtered on 0.2 µm black Nuclepore Polycarbonate Membrane Filters (Whatman) and stored at -20 °C. In addition, 0.5 g filter material was incubated with detergent mix at weak mixing conditions for 30 minutes. The buffer was prepared with DI-H<sub>2</sub>O, containing disodium EDTA dihydrate (100 mM), sodium pyrophosphate decahydrate (100 mM) and TWEEN 80 (1 % vol/vol) (Kallmeyer et al. 2008). Afterwards, the liquid phase was pipetted off with exhausting the filter material and collected in appropriate tubes. This procedure was repeated twice for optimal detachment of cell assemblages from filter material. Slurries were centrifuged at 8,000 g for 20 min (Eppendorf 5804). Sample fixation was carried out according to Pernthaler et al. (2001). Pellets were fixed with 4 % formaldehyde (3 vol/vol) for 4 h at 4 °C. The fixed samples were washed with phosphate-buffered saline (PBS) solution (1x, pH 7.2-7.4) and stored in Ethanol-PBS (1:1) at -20 °C. All samples were diluted 1:10 with 1x PBS solution. The cells were detached from solid particles by mild sonication for 10 s with a MS73 probe (Sonoplus HD70; Bandelin, Berlin, Germany).

A volume of 10 µl of each prepared filter sample was spotted on gelatine-coated Teflon-laminated slides (Zarda et al. 1997). The slides were dried at 45 °C for 15 min. The membrane filters were cut in small pieces (3x3 mm) and also placed on slides. Subsequently, 10 µl of DAPI (4',6-diaminodino-2-phenylindole, 1 mg ml<sup>-1</sup> working solution) was dropped onto each

## Ergebnisse

---

well and incubated in the dark at room temperature for 10 min, as described by Morozova et al. (2010). Afterwards, the slides were washed in ice-cold double-distilled water and allowed to air-dry. Finally, the slides were embedded in Citifluor AF1 antifading solution (Plano, Wetzlar, Germany), covered with a coverslip and were examined microscopically using Axio Imager M2 (Zeiss, Germany).

### **DNA extraction and SSCP- and DGGE-fingerprinting**

To investigate microbial community structure in fluid and filter samples, the genetic fingerprinting techniques single strand conformation polymorphism (SSCP, Schwieger and Tebbe 1998) and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE, Muyzer et al. 1996) were used to characterize the dominant species. These cultivation-independent approaches based on polymerase chain reaction (PCR) -amplified 16S rRNA genes from bacterial DNA, extracted from the samples allow the determination of differences in a variety of samples and the detection of changes in community structure over time. In these PCR reactions specific starter molecules called “primers” were used to detect different bacterial groups with genes encoding for specific metabolic enzymes. For generation of genetic profiles, PCR products are separated electrophoretically and stained for visualization. Different band intensities are reflecting the relative abundance of species in the community. By DNA sequencing of dominant bands in the profiles the dominant organisms become phylogenetically classified and subsequent metabolically characterized.

In detail, for DNA extraction cellulose acetate filters (Whatman) and filters bags were cut with sterile scalpel into 3x3 mm pieces. DNA was extracted using the MoBio Ultra Clean Soil Kit (Carlsbad, USA) according to the standard operating procedure. To reduce shearing of DNA, cells of the cellulose acetate filter were lysed alternatively by heating (2x 5 min at 80 °C) and vortexing for 5 seconds.

Partial sequences of the 16S rRNA genes were amplified by PCR using universal primers that hybridized to all bacteria (com1/com2-ph, Schwieger and Tebbe 1998) and primers encoding the dissimilatory sulphite reductase  $\beta$ -subunit in sulphate reducing communities (DSR2060F-GC/DSR4R, Geets et al. 2006). Products of universal PCR were analyzed by SSCP-analysis according to Schwieger and Tebbe (1998) and Dohrmann and Tebbe (2004). DNA in



## Ergebnisse

---

polyacrylamide gels was visualized by silver-staining (Bassam et al. 1991). Products of SRB (sulphate reducing bacteria) -specific PCR were analyzed by DGGE-analysis according to Muyzer et al. (1996) and with a denaturant gradient ranging from 40 % to 85 %. DNA in polyacrylamide gels was visualized by ethidium bromide staining (1 %) and gel images were obtained using GeneFlash (Syngene). Dominant bands of SSCP- and DGGE-profiles were cut from the gel, reamplified and directly sequenced using the corresponding 16S rDNA primers. Nucleotide sequences were aligned by the use of the software package ARB (<http://www.arb-home.de>) and were compared with the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) function of the NCBI database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Sequences analyzed in this study have been deposited in the EMBL database of the European Bioinformatics Institute ([www.ebi.ac.uk/embl](http://www.ebi.ac.uk/embl)) under the accession numbers HQ690775 to HQ690806.

### **Mineralogical and geochemical analyses**

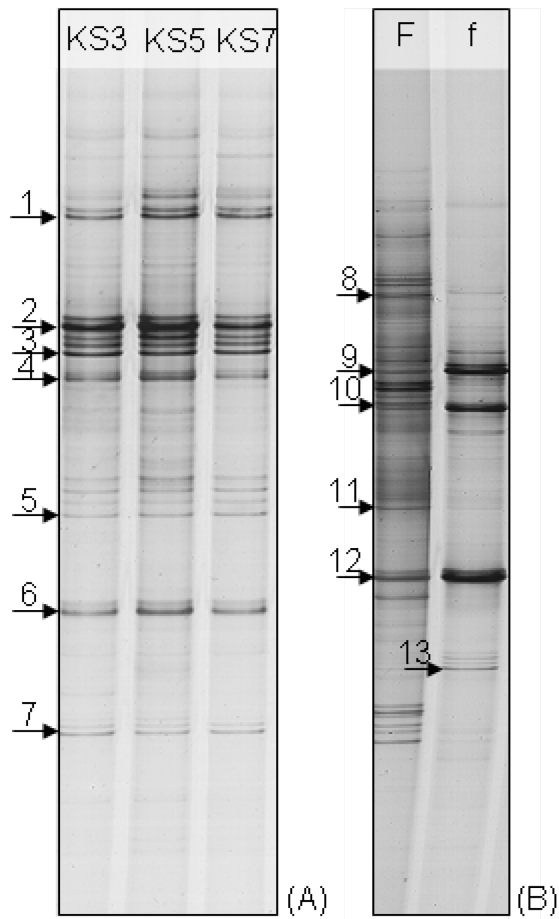
The solid particles in the filters were analyzed using scanning electron microscopy (Cambridge S200) with energy dispersive X-ray spectroscopy (SEM-EDX). The concentrations of inorganic anions (e.g. nitrate, sulphate) and the dissolved low molecular weight organic acids (e.g. acetate) in fluids were quantified by ion chromatography (ICS 3000, Dionex Corp.) as previously described by Vieth et al. (2008). The redox potential, pH and fluid temperature were determined during the sampling procedures using a pH/mV/temperature meter (WTW). The oxygen concentration was determined by an electrode, installed in a flow-through chamber in order to measure in a continuous flow environment and to improve the detection limit ( $0.01 \text{ ml l}^{-1}$ ). The iron content was quantified by ion chromatography according to DIN EN ISO 10304-2.

### 3.2.5. Results and Discussion

#### Microbial community structure in well fluid

SSCP-fingerprintings of well fluids (KS 3, KS 5, KS 7), sampled once in 2006, showed similar profiles, comprising seven dominant bands each. The profiles are shown in Fig. 4A. Results of DNA sequencing of dominant bands are presented in Tab. 3 and revealed affiliations to *Nitrospirae* (band 5) and Beta-*Proteobacteria*, in particular to the metabolic versatile *Rhodocyclaceae* (band 1) and iron-oxidizing *Gallionella* species (bands 3 and 4). In addition, Epsilon-*Proteobacteria* (band 7) and sulphur-oxidizing organisms of the genus *Thiothrix* (band 6) were identified. Strains of *Thiothrix* have been reported to be mixotrophic, requiring several small organic compounds as well as a reduced inorganic sulphur source. Under anaerobic conditions, they are able to oxidize thiosulphate or intracellular sulphur globules with nitrate as terminal electron acceptor (Larkin and Shinabarger 1983, Nielsen et al. 2000, Rossetti et al. 2003). Even though the oxygen concentration was below the detection limit and nitrate was rarely detected with  $0.3 \text{ mg l}^{-1}$  on average, the mass flow rate has to be considered because it represents a continuous nitrate supply.

In addition, until recently, it was thought that iron-oxidation was limited to oxic or microaerobic environments. However, the characterization of microorganisms, capable of coupling nitrate-reduction to ferrous iron-oxidation, indicated that microorganisms can play a role in iron-oxidation also in anoxic habitats (Emerson et al. 2010). Even as no molecular oxygen was detected in fluids similar processes might be considered. Iron-oxidizing *Gallionella* sp. is probably responsible for the formation of iron hydroxides, using fluid present ferrous iron that was in a range of  $2.1$  to  $2.4 \text{ mg l}^{-1}$ . Iron hydroxide deposits were detected by the detailed analysis of solid particles using scanning electron microscopy (SEM-EDX) (Wolfgramm et al. 2010) (Fig. 7B). In 2007, filter slots in the well casing were clogged with iron hydroxides, necessitating well regeneration to re-establish sufficient well productivity. The well regeneration was done by cleaning the well casings using brushes, a chemical reagent (Aixtractor 2.0) and a fluid-pulse procedure. In addition, iron hydroxide deposits were the main mineral components formed in filter bags of the topside facility. In some cases the iron hydroxides formed thick crusts.



**Fig. 4.** SSCP-analysis of 16S rRNA gene fragments using bacterial DNA from fluid samples taken directly from wells KS 3, KS 5, KS 7 (north field, warm side) in march 2006 (A) and fluid (F) and filter (f) samples taken at the topside facility in June 2006 (B). Arrows indicate the positions of bands that were sequenced to identify the species of microorganisms and to conclude its metabolic capabilities.

## Ergebnisse

**Tab. 3:** Phylogenetic affiliation of partial bacterial 16S ribosomal RNA gene sequences from SSCP-profiles of well fluids (bands 1-7) and fluid and filter samples from the topside facility (bands 8-13)

Band	Phylum/Class	Closest relative, (Genbank accession number)	Similarity [%]	Genbank accession number
1, 8	Beta-Proteobacteria	Uncultured <i>Rhodocyclaceae</i> bacterium, clone 127, (FM207957)	98	HQ690775
2, 9		Uncultured bacterium, clone LKC3_198.29, (AY510251)	98	HQ690782
3		<i>Gallionella</i> sp., clone MWE_N10, ( FJ391503)	99	HQ690783
4		Uncultured <i>Gallionella</i> sp., clone HC16, (FJ391516)	99	HQ690777
10		Uncultured <i>Curvibacter</i> sp., clone 469C11, (EU127421)	97	HQ690778
11		Uncultured <i>Gallionella</i> sp., clone Hc1, ( FJ391520)	99	HQ690784
6	Gamma-Proteobacteria	<i>Thiothrix unzii</i> , (L79961 )	97	HQ690785
12		Uncultured <i>Thiotrichales</i> bacterium, clone MS4-42, (GQ354932)	98	HQ690780
7, 13	Epsilon-Proteobacteria	Uncultured bacterium, clone AA_25_UNI, (AB473796)	98	HQ690786
5	<i>Nitrospirae</i>	Uncultured <i>Nitrospirae</i> bacterium, clone 356, (AB252945)	100	HQ690781
				HQ690779

RNA ribonucleic acid, SSCP single strand conformation polymorphism

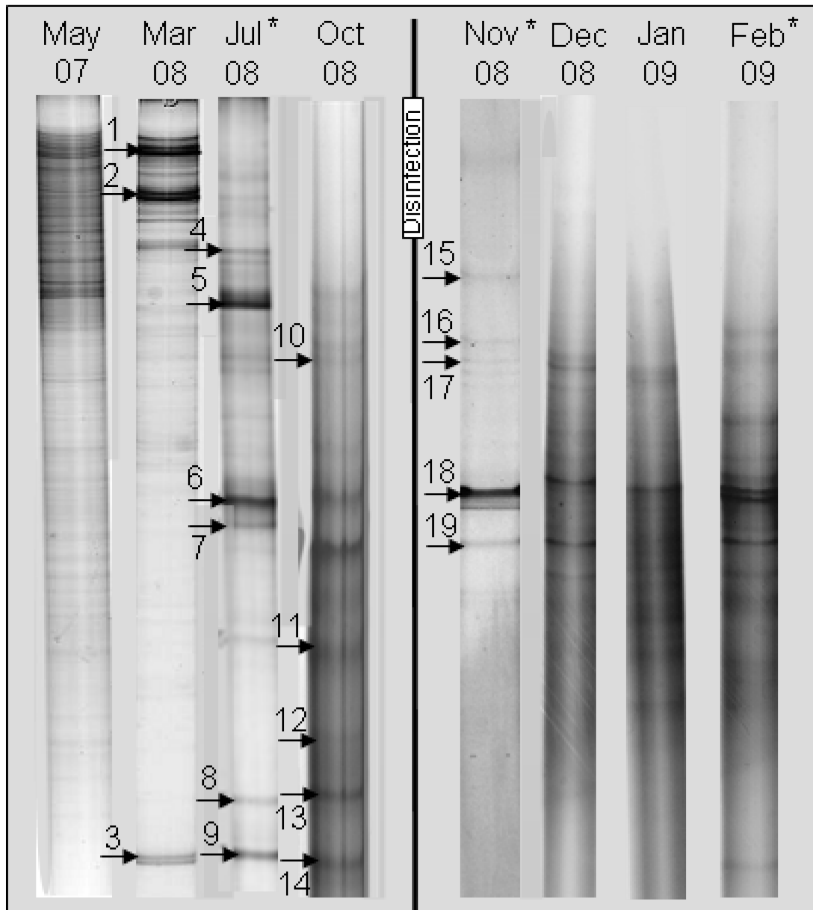
### Microbial community in fluid and filter of the topside facility

The SSCP-profiles gained from fluid and filter of the topside facility, sampled in June 2006, differed in band intensities, but not in the relative abundance of bands (Fig. 4B). Results of DNA sequencing of the dominant bands are also presented in Table 3 and revealed same microbes as predominating in well fluids, like the *Rhodocyclaceae* bacterium (band 8), *Gallionella* sp. (band 11), *Thiotrichales* (band 12) and Epsilon-Proteobacteria (band 13), with the exception of *Nitrospirae* relatives. However, betaproteobacterial *Curvibacter* species were detected additionally in fluids of the topside facility. These minor differences in microbial composition could probably lead back to the fact that the fluid, sampled at the topside facility, is a mixture of the currently producing wells.

The period, monitored from May 2007 till February 2009, was characterized by two distinct phases: undisturbed plant operation and a period with a drastically reduced injectivity and reduction of filter lifetime. During normal filter lifetimes of 1,850 hours on average, the total cell counts in fluid samples taken at the topside facility amounted circa  $1 \times 10^5$  cells per ml. This is in the same magnitude of cell counts obtained with DAPI-staining for groundwater from different types of aquifers (Ghiorse and Wilson 1988, Goldscheider et al. 2006). SSCP-profiles gained from fluid and filter samples of the topside facility in this period, comprised up to eight dominant bands that differed significantly in abundance and intensity over time (Fig. 5). DNA sequencing of the dominant bands revealed the presence of Beta-, Delta-,

## Ergebnisse

Epsilon-, Gamma-*Proteobacteria*, and *Flavobacteria* with 92 to 100 % similarity to sequences in the GenBank database (Tab. 4).



**Fig. 5.** SSCP-analysis of PCR-amplified 16S rRNA gene fragments of bacterial community DNA extracted from fluid and filter (\*) samples taken at the topside facility from May 2007 till February 2009. Arrows indicate the positions of bands that were sequenced to identify the species of microorganisms and to conclude its metabolic capabilities.

## Ergebnisse

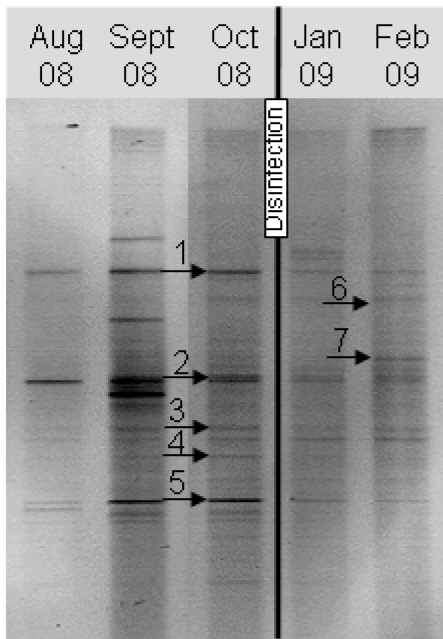
**Tab. 4:** Phylogenetic affiliation of partial bacterial 16S ribosomal RNA gene sequences from SSCP-profiles of fluid and filter samples from the topside facility

Band	Class	Closest relative, (Genbank accession number)	Similarity [%]	GenBank Accession Number
1	Beta- <i>Proteobacteria</i>	Uncultured <i>Aquaspirillum</i> sp., clone T5-4, (AF526926)	99	HQ690788
2		<i>Ferribacterium</i> sp., clone 24-19 (HM124374)	97	HQ690789
4		<i>Rhodocyclaceae</i> bacterium, clone FTL11, (DQ451827)	99	HQ690791
5		Uncultured bacterium, clone LKC3_198.29, (AY510251)	98	HQ690792
7		<i>Bacteroidetes</i> bacterium, clone VNs52, (FJ168485)	93	HQ690794
10		<i>Nitrosospira</i> sp., clone 17SS, (EF015571)	97	HQ690797
17		Uncultured <i>Propionivibrio</i> sp., clone RUGL1-577, (GQ420984)	97	HQ690804
3	Epsilon- <i>Proteobacteria</i>	<i>Sulfuricurvum kujjense</i> , strain YK-2, (AB080643)	98	HQ690790
8		Uncultured bacterium, clone AA_25_UNI, (AB473796)	93	HQ690795
9		Uncultured bacterium, clone MVP-6, (DQ676341)	98	HQ690796
6	Gamma- <i>Proteobacteria</i>	Sulphur-oxidizing bacterium, clone NBRC 105220, (AB506456)	98	HQ690793
11		Uncultured <i>Thiothrix</i> sp., clone U3-AlvEE, (AB425225)	92	HQ690798
12, 13		<i>Thiothrix unzii</i> , (L79961)	94, 95	HQ690799
14		Uncultured <i>Thiothrix</i> sp., clone U3-AlvEE, (AB425225)	97	HQ690801
15	<i>Flavobacteria</i>	<i>Flavobacterium psychrolimnae</i> , (AB455260)	99	HQ690802
16		Uncultured bacterium, clone HY7, (AB263622)	98	HQ690803
18		<i>Flavobacterium</i> sp., clone NMC26, (GU321361)	100	HQ690805
19		<i>Flavobacterium</i> sp., clone HMD1068, (GU291855)	99	HQ690806

RNA ribonucleic acid, SSCP single strand conformation polymorphism

The predominance of *Proteobacteria* in the microbial community of the process fluid is consistent with previous observations within several freshwater ecosystems (López-Archilla et al. 2007, Blöthe and Roden 2009, Griebler and Lueders 2009) showing *Proteobacteria* particularly involved in cycling of iron- and sulphur-compounds (López-Archilla et al. 2007, Haaijer et al. 2008, Weber et al. 2006, Lerm et al. 2011b). In addition, sulphate reducing bacteria were detected by specific PCR-DGGE-profiling (Fig. 6, Tab. 5). However, the redox potential measured in the fluid ranged between 40 and 80 mV and sulphate reduction is typically characterized by lower redox potential of less than -150 mV different redox-zones which may have existed in biofilms could have provided the conditions favorable for such strict anaerobic processes.

## Ergebnisse



**Fig. 6.** DGGE-analysis of PCR-amplified *dsrB* fragments of sulphate reducing bacterial community from fluid samples taken at the topside facility from August 2008 till February 2009. Arrows indicate the positions of bands that were sequenced to identify the species of microorganisms and to conclude its metabolic capabilities.

**Tab. 5:** Phylogenetic affiliation of partial bacterial 16S ribosomal RNA gene sequences from SRB-specific DGGE-profiles of fluid samples from the topside facility

Band	Domain	Closest relative, (Genbank accession number)	Similarity [%]	Genbank accession number
1	Bacteria	Uncultured sulphate-reducing bacterium clone LGWI06, (EF065053)	82	HQ690807
2		Uncultured sulphate-reducing bacterium clone LGWN07, (EF065094)	85	HQ690808
3		Uncultured sulphate-reducing bacterium clone UMTRAdsr826-5, (AY015614)	92	HQ690809
4		Uncultured sulphate-reducing bacterium clone LGWK18, (EF065071)	88	HQ690810
5		Uncultured sulphate-reducing bacterium clone LGWK18, (EF065071)	94	HQ690811
6		Uncultured sulphate-reducing bacterium clone LGWG25, (EF065022)	80	HQ690812
7		Uncultured sulphate-reducing bacterium clone Dikom_E8, (FJ648430)	87	HQ690813

RNA ribonucleic acid, SRB sulphate reducing bacteria, DGGE denaturing gradient gel electrophoresis

Heterotrophic Beta-*Proteobacteria* of denitrifying *Aquaspirillum* species (band 1), iron (III)-reducing *Ferribacterium* species (band 2) and sulphate reducing bacteria dominated in March 2008, operation with normal filter lifetimes. These organisms are classically identified within freshwater environments and aquifers that can be stagnant or brackish, containing organic

## Ergebnisse

---

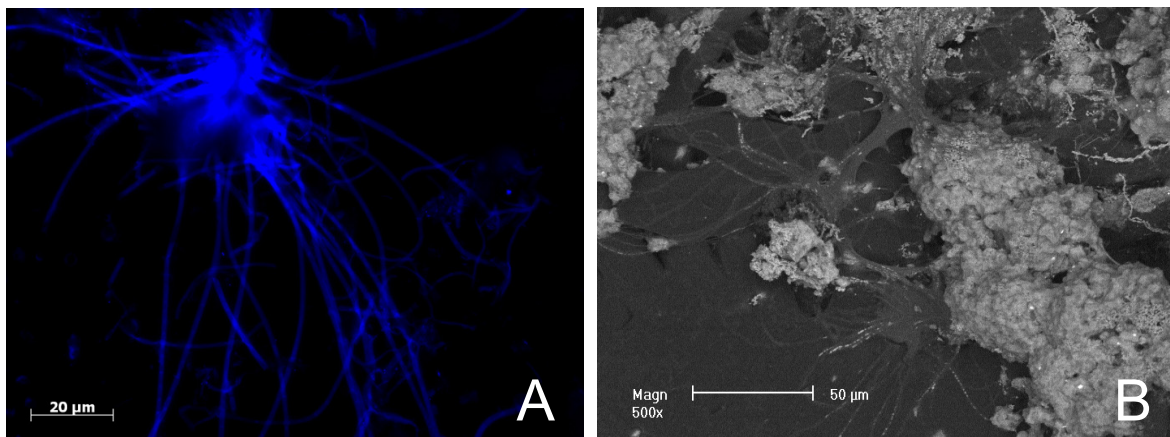
matter (Cummings et al. 1999, Pot et al. 2002, Dann et al. 2009, Wu and Yang 2009). In addition, relatives of the epsilonproteobacterial species *Sulfuricurvum kujiense* (band 3), which is associated with oxidation of reduced sulphur compounds and nitrate-reduction in sulphidic environments (Kodama and Watanabe 2003), were detected in this period, too. *S. kujiense* was recently also observed in other shallow aquifers, used for geothermal heat storage (Lerm et al. 2011b). The simultaneous presence of oxidizing and reducing microorganisms indicates an internal syntrophic iron- and sulphur-cycle that has been described previously for aquatic systems (Holmer and Storkholm 2001, Weber et al. 2006, Blöthe and Roden 2009), partly rich in their sulphide content (Macalady et al. 2006, Satoh et al. 2009, Engel et al. 2010), hydrothermal vents, microbial mats, marine sediments, and wastewater biofilms (Celis-García et al. 2008). The reduction in filter lifetime, related to the total amount of fluid volume passing the filters, indicated problems in plant operation due to filter clogging. This was preceded by an increase in the DOC-content in fluids from 3.7 mg l<sup>-1</sup> in March up to 6.2 mg l<sup>-1</sup> in August. In addition, this corresponded with a shift in the bacterial community structure. During the period from July till November 2008, showing decreasing filter lifetimes, Beta-*Proteobacteria* of metabolic versatile *Rhodocyclaceae* (band 4), fermentative *Bacteroidetes* (band 7) and Epsilon-*Proteobacteria* (bands 8 and 9) became predominant. Members of the phylum *Bacteroidetes* are frequently abundant in freshwater and marine ecosystems and may have a specialized role in the uptake and degradation of organic matter in aquatic environments (Kirchman 2002). In addition, the abundance of sulphate reducing bacteria probably increased, as indicated by strong DGGE band patterns and a slight decrease in the fluid sulphate concentration from 200 mg l<sup>-1</sup> down to 164 mg l<sup>-1</sup> from August till November.

The following period of minimal filter lifetimes with finally 350 h compared to maximal 2,500 h corresponded with increasing cell numbers up to 9.8 x 10<sup>5</sup> cells per ml. The microbial community was characterized by the predominance of gammaproteobacterial sulphur-oxidizing Gamma-*Proteobacteria* of the genus *Thiothrix* (bands 6, 11-14) and ammonia-oxidizing *Nitrosospira* species (band 10). Relatives of the genus *Nitrosospira* appear very abundant in anoxic marine sediments (Freitag and Prosser 2003), are often related to nitrogen contamination in groundwater environments and use nitrite as electron acceptor (Ivanova et al. 2000, Kampschreur et al. 2006, Miller and Smith 2009, Reed et al. 2010). Strains of



## Ergebnisse

*Thiothrix* are characterized by ensheathed filaments that may attach to substrates with slimelike holdfasts and form rosettes (Brigmon and de Ridder 1998). McGlannan and Makemson (1990) revealed a predominance of *Thiothrix* species in a habitat under favorable conditions, being nearly a monoculture. The capability of outcompete other bacteria probably allowed the predominance of *Thiothrix* in the studied cold store. In addition, *Thiothrix* sp. were detected in flowing water, containing sulphide concentration of at least  $0.1 \text{ mg l}^{-1}$ , less than 10 % oxygen and with neutral pH, like cave water (Macalady et al. 2008), wastewater treatment systems (Farquhar and Boyle 1972, Nielsen et al. 2000, Eikelboom and Geurkink 2002), and in a natural spring and municipal water storage tank (Brigmon et al. 2003). In all these systems *Thiothrix* caused problems due to sludge bulking by the formation of white filamentous biofilms. Biofilms containing *Thiothrix* induced biofouling and led to physical blockage of water pipes and other groundwater processing equipment like agricultural irrigation systems and spring water bottling plant filters (Ford and Tucker 1975, Brigmon et al. 1997). Consistently, this predominance of *Thiothrix* may have led to the drastically reduced filter lifetimes of the investigated cold store. Large quantities of long filaments ( $> 100 \text{ }\mu\text{m}$ ), known from *Thiothrix* sp., forming radial rosettes, were visualized by DAPI-staining and SEM-analysis, especially in the filter samples, anticipating any quantification (Fig. 7A).



**Fig. 7.** Fluorescence microscopic image of DAPI-stained filamentous cells in a filter bag from September 2008 (A), SEM-image of iron hydroxide crusts (light grey), wrapped with filaments (mid grey) in a filter bag (dark grey) from August 2008 (B).

## Ergebnisse

---

The reasons for changing conditions favoring the growth of *Thiothrix* are not clear because no relation to plant operation, fluid recharge and discharge processes in particular could be ruled out. However, since temperatures in winter 2007/2008 were relatively mild with 8.7 °C on average, elevated temperatures in the wells might have influenced the microbial interactions, resulting in changed microbial composition and enhanced growth of *Thiothrix* sp. that has been detected already in well fluids at this site in 2006. In addition, the shift to oxidative processes indicates changes in the chemical fluid composition, although significant changes in e.g. concentrations of electron acceptors like nitrate or oxygen were not observed by chemical monitoring of the process water. If the chemical compounds are present only for a short time in the fluid they can be hardly detected by a 1-month interval sampling. However, biological systems may reflect temporary changed conditions. This is may be enhanced due to intracellular storage of metabolic relevant compounds.

In contrast, the composition of sulphate reducing bacteria did not change significantly during reduced filter lifetimes. However, metabolism of the sulphate reducing bacteria probably contributed to the filter clogging by formation of iron sulphide deposits, detected in filter bags of the topside facility by SEM-analyses (Wolfgramm et al. 2010). In addition, the produced sulphids were probably substrates for the filamentous *Thiothrix*. Beyond that, Wolfgramm et al. (2010) reported an increase in the relative percentage of sulphidic precipitations in filter materials since plant start-up.

To re-establish the injectivity of the wells and to recover filter lifetime as in time before failure, a disinfection treatment with the reactive oxidative hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) was conducted. After this chemical plant treatment heterotrophic bacteria, in particular *Flavobacteria* (*Flavobacterium* sp., bands 15, 18-19) and *Beta-Proteobacteria* (*Propionivibrio* sp., band 17) became predominant, whereas *Epsilon-Proteobacteria* and *Thiothrix* sp. were not detected any longer. Again, the banding pattern of sulphate reducing bacteria was not influenced by the disinfection treatment. The treatment with hydrogen peroxide probably disturbed the biofilms of *Thiothrix* sp. in plant processing equipment and recovered normal filter lifetimes. In addition, reduced sulphide minerals became oxidized, preventing any subsequent precipitation and withdrawing the substrate for sulphur-oxidizing *Thiothrix* sp.. The slight decrease in total bacterial counts to 1.7 x 10<sup>5</sup> cells per ml fluid demonstrated the efficiency of the disinfectant and the die-off of microorganisms. In drinking water installations the

## Ergebnisse

---

disinfection with chlorine, ozone, and UV have been also successfully tested for the control of microbes and biofouling (Smith 2002). However, the detection of microorganisms after a disinfection treatment, especially species of *Flavobacteria*, is documented in several studies. Kim et al. (2000) demonstrated a hydrogen peroxide resistance of *Flavobacterium* sp. in a high-purity water system. This insensitivity against the strong oxidative agent is probably based on the enzyme apparatus of this genus. *Flavobacterium* sp. is catalase positive and thus able to degrade hydrogen peroxide to water and oxygen (Holmes et al. 1984). In addition, *Flavobacterium* sp. was tolerant to other disinfectant chemicals, like chlorine and chloramines that caused the die-off of microorganisms in a drinking water reservoir (Wolfe et al. 1985). In this context, *Thiothrix* sp. is catalase negative and was not detected after the treatment with hydrogen peroxide anymore. Furthermore, *Propionivibrio* sp. was detected in chlorine treated drinking water (Williams et al. 2004). To our knowledge, up to now, there are no studies presenting resistance of *Propionivibrio* sp. against hydrogen peroxide treatment, but based on our results and the resistance against the oxidative disinfectant chlorine one can assume this. In accordance with the unaffected abundance of SRB, catalase activity was also detected in sulphate reducing bacteria, allowing hydrogen peroxide elimination and survival at oxygen exposure (Cypionka et al. 1985, Dolla et al. 2006). Further investigations focusing the effectiveness of disinfectants and certain microbial insensitivities in groundwater systems are required.

### 3.2.6. Conclusion

This study demonstrates that microbes may have a considerable influence on the reliability and operating lifetime of a geothermal plant that is used for energy cold storage. Molecular biological monitoring was able to identify the dominant microorganisms, especially involved in metabolic iron- and sulphur-cycling. The interpretation of shifts in the microbial community composition, correlated with precipitated minerals, supported the plant operation under the aspect of problem identification and countermeasures. However, changes in chemical parameters could not be indicated by monitoring of process water. *Thiothrix* served as an as indicator organisms for increased filter clogging in the topside facility as well as in the injection wells, probably due to slight changes in the availability of electron acceptors and

## Ergebnisse

---

more favourable temperature conditions. More detailed monitoring of environmental conditions during process failure and quantification of active cells is planned for the future to further increase process understanding.

### **Acknowledgments**

This research was funded by the BMU project "AquiScreen" (Nr. 0327634): Betriebssicherheit der geothermischen Nutzung von Aquiferen unter besonderer Berücksichtigung mikrobiologischer Aktivität und Partikelumlagerungen - Screening an repräsentativen Standorten. We thank Ben Cowie for critical revision of the manuscript.

### **3.3. Thermal effects on microbial composition and microbiologically induced corrosion and mineral precipitation affecting operation of a geothermal plant in a deep saline aquifer**

*Dritte Veröffentlichung: Manuskript akzeptiert zur Veröffentlichung in der Zeitschrift  
Extremophiles*

**Autoren:** Stephanie Lerm<sup>1</sup>, Anke Westphal<sup>1</sup>, Rona Miethling-Graff<sup>1</sup>, Mashal Alawi<sup>1</sup>, Andrea Seibt<sup>2</sup>, Markus Wolfgramm<sup>3</sup>, Hilke Würdemann<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Helmholtz Centre Potsdam GFZ German Research Centre for Geosciences, International Centre for Geothermal Research ICGR, Telegrafenberg, D-14473 Potsdam, Germany

<sup>2</sup> Boden Wasser Gesundheit GbR. (BWG), D-17041 Neubrandenburg, Germany

<sup>3</sup> Geothermie Neubrandenburg (GTN), D-17041 Neubrandenburg, Germany

### 3.3.1. Abstract

The microbial diversity of a deep saline aquifer used for geothermal heat storage in the North German Basin was investigated. Genetic fingerprinting analyses revealed distinct microbial communities in fluids produced from the cold and warm side of the aquifer. Direct cell counting and quantification of 16S rRNA genes and dissimilatory sulfite reductase (*dsrA*) genes by real-time PCR proved different population sizes in fluids, showing higher abundance of bacteria and sulfate reducing bacteria (SRB) in cold fluids compared with warm fluids. The operation-dependent temperature increase at the warm well probably enhanced organic matter availability, favoring the growth of fermentative bacteria and SRB in the topside facility after the reduction of fluid temperature. In the cold well, SRB predominated and probably accounted for corrosion damage to the submersible well pump, and iron sulfide precipitates in the near wellbore area and topside facility filters. This corresponded to lower sulfate content in fluids produced from the cold well as well as higher content of hydrogen gas that was probably released from corrosion, and maybe favored growth of hydrogenotrophic SRB. This study reflects the high influence of microbial populations for geothermal plant operation, because microbiologically induced precipitative and corrosive processes adversely affect plant reliability.

### 3.3.2. Introduction

As subsurface structures have been increasingly investigated, it has become evident that phylogenetically and physiologically diverse microorganisms are widely distributed throughout deep terrestrial and marine environments and catalyze a broad range of geochemical reactions. These reactions are related to the degradation of organic matter (Parkes et al. 1994, 2000; Whitman et al. 1998; Wellsbury et al. 2002), rock and mineral weathering and alteration (Rogers et al. 1998; Bennett et al. 2001; Shock 2009; Gadd 2010), quality of groundwater (Goldscheider et al. 2006; Wilson et al. 2006; Griebler and Lueders 2009), and failures in engineered subsurface systems caused by corrosion and scaling (Van Hamme et al. 2003; Valdez et al. 2009; Javaherdashti 2011). Geothermal gradients in the terrestrial crust range from approximately  $10^{\circ}\text{C km}^{-1}$  to  $60^{\circ}\text{C km}^{-1}$  (Philpotts 1990). In addition, in certain regions, such as the Mesozoic deep waters developed in northeast

## Ergebnisse

---

Germany, aquifers are classified as high-salinity Na-Ca-Cl-waters (Wolfgramm et al. 2011). Elevated temperature and high salinity create harsh living conditions for microbes. Only specific microorganisms subsist at these elevated temperatures and high salinity due to modifications in proteins, DNA, and cell membrane composition as well as intracellular accumulation of low molecular compounds (Aerts et al. 1985; Kempf and Bremer 1998; Kumar and Nussinov 2001; Roberts 2005). Moreover, some microorganisms are able to get into a dormancy stage by forming spores, cysts or other types of resting cells and survive starvation, exposure to extreme temperatures, and elevated background radiation (Burke and Wiley 1937; Amy 1997; Suzina et al. 2004; Johnson et al. 2007).

The exploitation of sedimentary geologic formations in the North German Basin (NGB) has provided suitable conditions for temporary aquifer heat and cold storage (ATES aquifer thermal energy storage) (Schmidt et al. 2004). The regional groundwater system in the NGB can be subdivided into upper quaternary and tertiary fresh water and several deep Mesozoic salt water systems that are frequently separated by different aquitards. In recent years, several geothermal facilities have been installed and are currently used for ATES, developing the freshwater and saline groundwater zone (Seibt and Kabus 2006).

Highly mineralized geothermal fluids with an excess of sulfate tend to scale formation (sulfide, carbonate, silica) in the reservoir, pipelines and topside structures when brine is cooled in the course of fluid production and energy extraction (Skinner et al. 1967; Dalas and Koutsoukos 1989; Gallup 2002). Furthermore, chemically and microbially induced corrosion additionally occurs in plant infrastructure and adversely affects plant operations and commercial benefits (Gallup 2009; Valdez et al. 2009; Miranda-Herrera et al. 2010). Therefore, the detrimental effect of microbes on power plant components has increasingly garnered attention. Indeed, several studies have been conducted to identify the organisms responsible for phenomena such as scaling, biofouling, and corrosion of installed iron or steel in groundwater wells and geothermal plants (Taylor et al. 1997; Sand 2003; Cullimore 2007; Little and Lee 2007; Valdez et al. 2009) to reduce these sources of failure, plant downtime, and the cost-intensive replacement of plant components. For example, the effectiveness of groundwater wells can be influenced by scaling, as iron and other metallic cations are enriched by precipitation that leads to the formation of amorphous or crystalline structures. Biofouling refers to the accumulation of microorganisms that form complex biofilms that include mineral deposits and adversely affect the hydraulic characteristics of water flow

## Ergebnisse

---

(Howsam 1988; Cullimore 1999). Microbiologically influenced corrosion (MIC) usually occurs with various types of corrosion and with scaling (Little et al. 1996; Valdez et al. 2009). Studies focusing on biofilms in several industrial water systems reported extensive biofouling and associated mineral precipitation leading to reduced efficiency of heat exchangers and reduced flow rates in the piping (Characklis 1990; Flemming 2002; Demadis 2003; Coetser and Cloete 2005).

Marine scientists and the petroleum industry rapidly recognized that phylogenetically diverse anaerobic sulfate reducing bacteria (SRB) are crucial for the degradation of organic matter in terrestrial and aquatic subsurface environments (Bastin et al. 1926; Jørgensen 1982; Magot et al. 2000; D'Hondt et al. 2002; Sass and Cypionka 2004) by using sulfate as a terminal electron acceptor, thereby producing hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S). Hydrogen sulfide is a toxic and corrosive gas that leads to a variety of environmental and economic problems, including reservoir souring, corrosion of metal surfaces, and the plugging of reservoirs due to the precipitation of metal sulfides (Magot et al. 2000). Therefore, SRB are considered important biocatalysts for MIC. Besides mackinawite and pyrrhotite, one of the most common metal sulfides is pyrite (FeS<sub>2</sub>), which is produced when microbially generated sulfide reacts with ferrous iron (Fe<sup>2+</sup>) that is present in natural water or released from corroded steel (Hamilton 1985; Morse et al. 1987). Based on research into these phenomena, specific chemicals are recommended for well regeneration and are used as inhibitors when continuously injected into geothermal installations (Videla 2002; Akpabio et al. 2011). Furthermore, new casing materials are used. Although biocorrosion is a common problem, it is site-specific and depends on fluid temperature as well as on the chemical conditions such as salinity and dissolved organic carbon (DOC)-content, and the abundant microbial community (Valdez et al. 2009). An understanding of the underlying mechanisms requires knowledge of the carbon and energy sources that support biofilm microorganisms and catalyze such activities. Thus far, only few studies focused on the microbial processes that occur in geothermal plants in the context of microbiologically mediated operational failure (Sand 2003; Pryfogle 2005; Alawi et al. 2011; Lerm et al. 2011a, b). As microorganisms are directly influenced by their environment, they can be used as bioindicators (Avidano et al. 2005; Steube et al. 2009) while reflecting changes in reservoir and topside conditions caused by aquifer utilization.

In this study, the microbial community structure in a deep saline aquifer in the NGB that is used for temporary aquifer heat storage was investigated. The operation of the geothermal



## Ergebnisse

---

plant which comprises of seasonal heat discharge and recharge processes is expected to be affected by microbial activities as well as by chemical reactions of the aquifer's minerals and organic matter. Therefore, we focused on the microbial and chemical processes that occur in the aquifer with respect to the operation of the geothermal plant. Direct cell counting, genetic fingerprinting, and real-time PCR based on 16S rRNA genes and genes encoding the dissimilatory sulfite reductase  $\beta$ -subunit (*dsrB*) of SRB were used for the detection and quantification of microorganisms abundant in fluids, to gain information on the conditions and processes occurring downhole. We were particularly interested in monitoring the presence, biodiversity and dynamics of SRB at this site, because they are known to be involved in sulfide precipitation and corrosion and, therefore, may significantly influence plant operation. Besides gas chromatographic determination of the gases dissolved in aquifer fluid, geochemical analyses were used to identify inorganic and organic substrates that are relevant as energy and carbon sources for microorganisms and products of microbial metabolism. Scanning electron microscopy (SEM) analyses of mineral scales from topside facility filters provided information on aquifer minerals and were useful for detecting microbiologically induced mineral scales.

### 3.3.3. Materials and methods

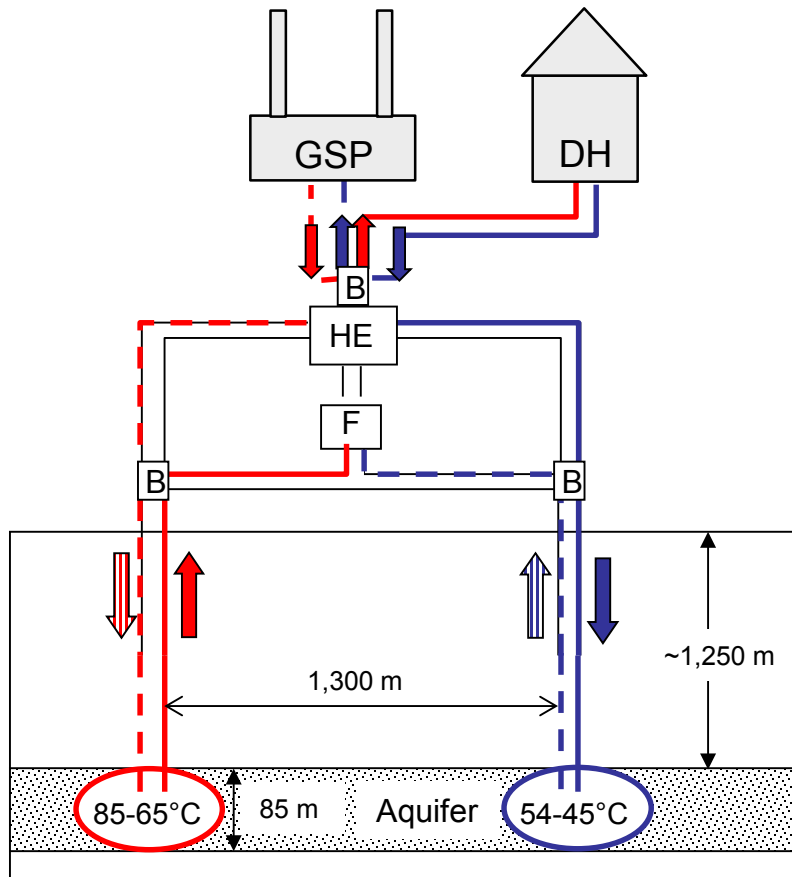
#### Site description and plant design

The investigated aquifer was located in Neubrandenburg (North German Basin, Germany) and has been used for seasonal heat storage since 2005. The water-bearing sandstone formation is situated at a depth of 1,228 m - 1,268 m and is developed by a geothermal doublet with an internal distance of 1,300 m between wells GtN 1/86 and GtN 4/86.

The original aquifer fluid temperature amounted to 54°C. During geothermal plant operation fluid temperature around well GtN 1/86 increased, because during the summer (April till November) fluid was produced from well 4/86, charged with surplus heat from the local gas and steam power station, and then injected into the warm well in the aquifer (recharge mode). This area is termed the “warm side”. Until September 2009, fluids at 80°C were injected to the warm well; subsequently the injection temperature was raised to 85°C. In addition, the operation of the plant caused a temperature decrease at the other well, GtN 4/86. This side is

## Ergebnisse

termed the “cold side”. A temperature decrease in the aquifer fluid was caused, because during the winter (November till April), fluid with a temperature from 65°C to 80°C was produced from the warm well, used for district heat supply, and was then injected into the cold well with a temperature of 45°C to 54°C (discharge mode).



**Fig. 1** Principle scheme of the ATEs used for heat storage with the location of sampling devices for fluid (B, bypass) and filter (F) at the topside facility. The *arrows* indicate the fluid flow direction during recharge (summer, dashed line) and discharge (winter, plane line) mode. GSP Gas and steam plant, DH District heating, HE Heat exchanger

Thus, during plant operation, the direction of fluid flow changed seasonally in April and November. In one season, between 200,000 m<sup>3</sup> and 400,000 m<sup>3</sup> of fluid was circulated, with an average flow rate of 80 m<sup>3</sup> h<sup>-1</sup>. The distribution of the quantities of the charged and discharged heat was not balanced; since plant startup the recharging period has lasted approximately 7.5 months per year and the discharging period has lasted approximately 4.5 months per year. Filter systems are installed upstream of the heat exchanger at the topside

## Ergebnisse

---

facility to retain solid particles transported with the production flow from the aquifer. Due to the different flow directions both wells are equipped with pumps, production and injection pipes, and a filter system (Fig. 1). The wells and the topside facility were kept under nitrogen pressure (~ 10 bar) to prevent precipitation of iron oxides or hydroxides, and carbonate minerals due to oxygen intrusion and degassing processes. Further information concerning plant operations and energetic aspects are given in Kabus and Wolfgramm (2009) and Obst and Wolfgramm (2010). Since the plant startup in 2005, three cycles of operations, including fluid discharge and recharge were completed. In 2008, plant operation was impaired due to corrosion damage to a submersible pump in the cold well that caused eight month of plant downtime.

### **Sample collection**

Fluid and filter samples were collected over a period of two years at the topside facilities of the two wells via a bypass and from filter devices. It should be noted that the plant is managed by the public utilities of the city Neubrandenburg and is not operating for research purposes. Thus, the access to samples, particularly filter samples, was partly restricted and samples were taken every few months and not in general at the production and injection well at the same time.

By investigating fluid and filter samples we minimized the risk of detecting only the suspended free cells because filters represent an appropriated surface on which microbes form biofilms. The bypasses are located upstream of the filter devices for each well. Each filter device contains 2 x 4 filters (EATON DURAGAF POXL 1 P02E 20l) with a 1-micron rating that are regularly replaced after a definite volume of fluid which has passed through the filter (termed filter lifetime). Filters were replaced more often and independent from the fluid volume in case of increased injection pressure caused by high particle loading rate, e.g., after plant restart. In addition to fluid sampling, filter samples were taken. Fluid samples were collected in sterile 1 liter Schott Duran glass bottles.

### Genetic fingerprinting

Characterization of bacterial communities in fluid and filter samples was done by AMODIA Bioservice GmbH (Braunschweig, Germany), including filtration of 1 liter fluid on a 0.22  $\mu\text{m}$  cellulose acetate filter (Sartorius, Goettingen, Germany), and using single strand conformation polymorphism (SSCP) fingerprinting of PCR-amplified 16S rRNA gene fragments according to Schwieger and Tebbe (1998) and Dohrmann and Tebbe (2004). Portions of the filter sample taken at the topside facility were processed in parallel with the fluid samples. Due to long-term monitoring, genetic profiles were generated individually for each sample and subsequently arranged. Partial sequences of the 16S rRNA genes were amplified by PCR using the universal bacterial primers F519 and R926-ph (Schwieger and Tebbe 1998). DNA concentrations of samples have not been adjusted during PCR procedures to approximately equalize the DNA yields in the samples in order to use SSCP-profiling as a semi-quantitative approach.

For the specific analysis of the diversity of SRB denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) fingerprinting was performed (Muyzer and Smalla 1998). Total genomic DNA was extracted from filters using the FastDNA<sup>TM</sup> Spin Kit for Soil (MP Biomedicals, Santa Ana, USA) with protocol modifications, including gentle shaking of samples in lysis buffer to dissolve cells from cellulose acetate filters, longer period of time for DNA elution from matrix, followed by a higher final centrifugation step. Concentration of extracted DNA was determined fluorometrically (FLUOstar OPTIMA, BMG Labtech, Ortenberg, Germany). Genes encoding the dissimilatory sulfite reductase  $\beta$ -subunit (*dsrB*) of SRB were amplified using the primer set DSR2060F-GC/DSR4R (Geets et al. 2006). DGGE was performed at 59°C with a denaturant gradient from 40 % to 75 %. DNA in polyacrylamide gels was visualized by silver staining (Bassam et al. 1991). Nucleotide sequences obtained by DNA sequencing were aligned using the ARB package ARB (Ludwig et al. 2004) and were compared using the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) of the NCBI database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). The sequences analyzed in this study have been deposited in the EMBL database of the European Bioinformatics Institute ([www.ebi.ac.uk/embl](http://www.ebi.ac.uk/embl)) under the GenBank accession numbers JQ291307 - JQ291353 (16S rRNA gene sequences) and JQ411234 - JQ411236 (*dsr* gene sequences).

## Ergebnisse

---

### **Quantification of total bacterial 16S rRNA genes and *dsrA* genes by real-time PCR**

Abundances of bacteria and SRB were determined in six samples taken from the warm and cold well in January 2009, September 2009, and October 2009 by quantitative real-time PCR (qPCR) analysis of 16S rRNA genes and *dsrA* genes, respectively, using a StepOnePlus™ real-time PCR System (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA). Real-time qPCR was performed using Power SYBR® Green PCR Master Mix (Life Technologies). For the total Eubacteria quantification the primers 338F and 805R (Yu et al. 2005) were used for the 16S rRNA gene fragment, and cloned 16S rRNA gene from *Escherichia coli* (JM109) as a standard. Total SRB were quantified using the primers DSR1F (Wagner et al. 1998) and DSR500R (Wilms et al. 2007) for amplifying the *dsrA* operon, and cloned *dsrAB* genes from *Desulfotomaculum geothermicum* (DSMZ 3669) as a standard. Each 20 µL PCR reaction contained 10 µL Life Technologies Power SYBR Green, 0.2 µM of each primer, 10 µg BSA and 1 µL of template DNA. Thermal cycling included an initial denaturation step for 10 min at 95°C followed by 40-50 cycles of amplification with following parameters 10 s at 95°C, 20 s at 58°C, and 30 s at 72°C. After the run, a melting curve was recorded between 58°C and 95°C to discriminate between specific amplicons and unspecific fluorescence signals. Real-time PCR was performed three times for each sample to verify the results.

For standard curves, total DNA of *E. coli* (JM 109) was extracted using the manufacturer's protocol of the FastDNA™ Spin Kit for Soil (MP Biomedicals, Santa Ana, USA). Total genomic DNA of *Desulfotomaculum geothermicum* (DSMZ 3669) was obtained from the Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig, Germany). Nearly full-length 16S rRNA genes and *dsrAB* genes were PCR amplified from extracted DNA with the primers 27F/1492R (Lane 1991), and DSR1F/DSR4R (Wagner et al. 1998), respectively. After purification of PCR products using the Fermentas GeneJET™ PCR Purification Kit (THERMO Fisher Scientific, Waltham, USA), PCR products were subsequently ligated into the pGEM-T vector and transformed into competent *E. coli* (JM109) cells (pGEM-T Cloning Kit, Promega, Mannheim, Germany) according to the manufacturer's instructions. Colonies with inserts were selected by blue-white screening. The plasmids containing the target DNA fragments were checked by sequencing. DNA concentration of plasmid and plasmid dilutions ranging from 10<sup>-1</sup> to 10<sup>-8</sup> served as template for qPCR standard curves. The detection limit of the method was 3 x 10<sup>1</sup> genes l<sup>-1</sup> for the bacterial 16S rRNA

## Ergebnisse

---

genes and  $2 \times 10^2$  genes  $l^{-1}$  for the *dsrA* genes.

### **Direct cell counting**

Alternatively to qPCR, the total number of bacteria in the fluids produced from the warm and cold side of the aquifer was determined in random samples taken in January 2010 and February 2011, respectively, using direct microscopic cell counting. The commissioned laboratory MicroPro GmbH (Gommern, Germany) used an improved Neubauer counting chamber (depth 0.1 mm). Due to the high salinity in fluids, the detection limit amounted to  $10^4$  cells  $ml^{-1}$ .

### **Geochemical and mineralogical analyses**

The residues in the filters were analyzed using a scanning electron microscope (Cambridge S200) with energy dispersive X-ray spectroscopy (SEM-EDX). The redox potential, pH, and fluid temperature were determined during the sampling procedures using a pH/mV/temperature meter (WTW, Weilheim, Germany). Vetter et al. (2012) measured the concentrations of the dissolved low-molecular-weight organic acids (e.g., acetate) in the fluids using ion chromatography (ICS 3000, Dionex Corp.) as previously described by Vieth et al. (2008). In particular, we focused on the ions participating in processes related to the detected microorganisms. The sulfate and iron content were quantified by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) according to DIN EN ISO 17294-2 and by ion chromatography according to DIN EN ISO 10304-2, respectively. Fluid-soluble anions and cations were determined including ion balance calculations. The oxygen concentration was determined using an electrode installed in a flow-through chamber for measurements in a continuous-flow environment and to improve the detection limit ( $0.01$  ml  $l^{-1}$ ). Gases such as nitrogen, carbon dioxide, methane, hydrogen, hydrogen sulfide, and helium were released from the fluid on-site using a mobile degasser, and the gas volume was subsequently quantified using a drum-type gas meter. The gas compositions were determined in the lab using a gas chromatograph. Further details concerning gas measurements in geothermal fluids are given in Seibt and Thorwart (2011).

# Ergebnisse

## 3.3.4. Results

### Geochemical characterization of fluids

The hydrochemical parameters of the investigated process fluids are summarized in Table 1.

**Table 1** Physico-chemical fluid characteristics

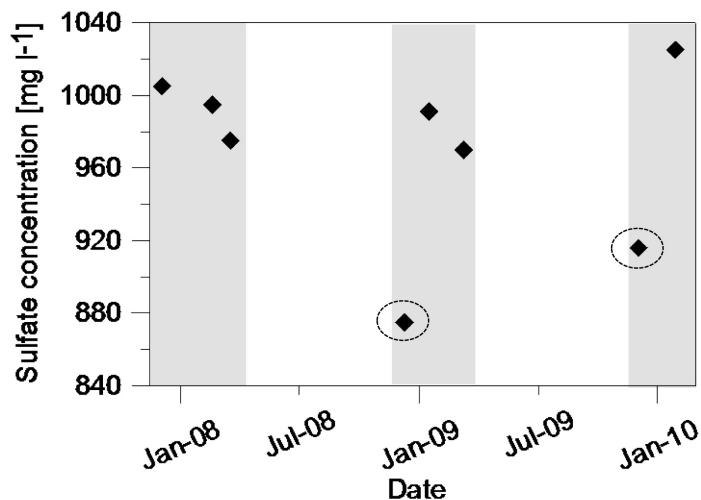
Reservoir rock	Depth [m]	Temperature [°C]	pH	Mineralisation [g l <sup>-1</sup> ]	Redox potential SHE [mV]	DOC [mg C l <sup>-1</sup> ]	Sulfate [mg l <sup>-1</sup> ]	Ferrous iron [mg l <sup>-1</sup> ]	Gases [vol.-%]
sandstone	1,250 - 1,335	45-54 <sup>c</sup> 65-85 <sup>w</sup>	6.0	131	< -50	~3.5	900 <sup>c</sup> 1,000 <sup>w</sup>	15 (±2)	CO <sub>2</sub> ~86 <sup>c, w</sup> N <sub>2</sub> ~14 <sup>c, w</sup> H <sub>2</sub> ~0.2 <sup>c</sup> / 0.03 <sup>w</sup> H <sub>2</sub> S ~0.2 <sup>c</sup> / b.d.l. <sup>w</sup> CH <sub>4</sub> 0.09 <sup>c</sup> / b.d.l. <sup>w</sup>

SHE standard hydrogen electrode, DOC dissolved organic carbon, well-specific values indicated with c cold well, w warm well, b.d.l. below detection limit

The fluid with a slight acidic pH had a mineralization of 130 - 134 g l<sup>-1</sup>, with sodium and chloride concentrations of 50 (± 1) g l<sup>-1</sup> and 80 (± 2) g l<sup>-1</sup>, respectively. Additional components were calcium, magnesium, potassium, and hydrogen carbonate in significant lower proportions. Aquifer fluid was characterized by a high sulfate concentration (900 - 1,000 mg l<sup>-1</sup>); whereas the sulfate content of fluids originating from the cold side of the aquifer was approximately 100 mg l<sup>-1</sup> lower than the fluids from the warm side of the aquifer. Remarkably, at the beginning of the discharge period the sulfate content of fluids produced from the warm well was also approximately 100 mg l<sup>-1</sup> lower (Fig. 2). The DOC content was approximately 3.5 mg C l<sup>-1</sup>. Small amounts of the short-chain organic acids formate and acetate were detected, ranging between 0.1 mg l<sup>-1</sup> and 1.9 mg l<sup>-1</sup> (Vetter et al. 2012). The redox potential of less than -50 mV of the fluid represented anoxic, reduced conditions. No oxygen was detected in the fluids. The total gas content of the fluids amounted to 7 %, while carbon dioxide (86.2 vol.-%) and nitrogen (13.8 vol.-%) were the predominant gases. The hydrogen content of the fluids produced from the warm and cold well of the aquifer was approximately 0.03 vol.-% and 0.21 vol.-%, respectively, and trace quantities of methane were only detected in fluids produced from the cold well. In addition, hydrogen sulfide was only detected in fluids produced from the cold well, with average values of 0.2 vol.-%. fluid with a slight acidic pH had a mineralization of 130–134 g l<sup>-1</sup>, with sodium and chloride concentrations of 50 (± 1) g l<sup>-1</sup> and 80 (± 2) g l<sup>-1</sup>, respectively. Additional components were

## Ergebnisse

calcium, magnesium, potassium, and hydrogen carbonate in significant lower proportions. Aquifer fluid was characterized by a high sulfate concentration (900–1,000 mg l<sup>-1</sup>); whereas the sulfate content of fluids originating from the cold side of the aquifer was approximately 100 mg l<sup>-1</sup> lower than the fluids from the warm side of the aquifer. Remarkably, at the beginning of the discharge period the sulfate content of fluids extracted from the warm well was also approximately 100 mg l<sup>-1</sup> lower than the fluid from the warm well after at least one month fluid production (Fig. 2).



**Fig. 2** Seasonal course of sulfate concentration in fluids produced from the warm well. *Circles* indicate artifact sulfate values at the beginning of the discharge mode (as marked by the grey-shaded area) caused by previous injection of fluids produced from the cold well

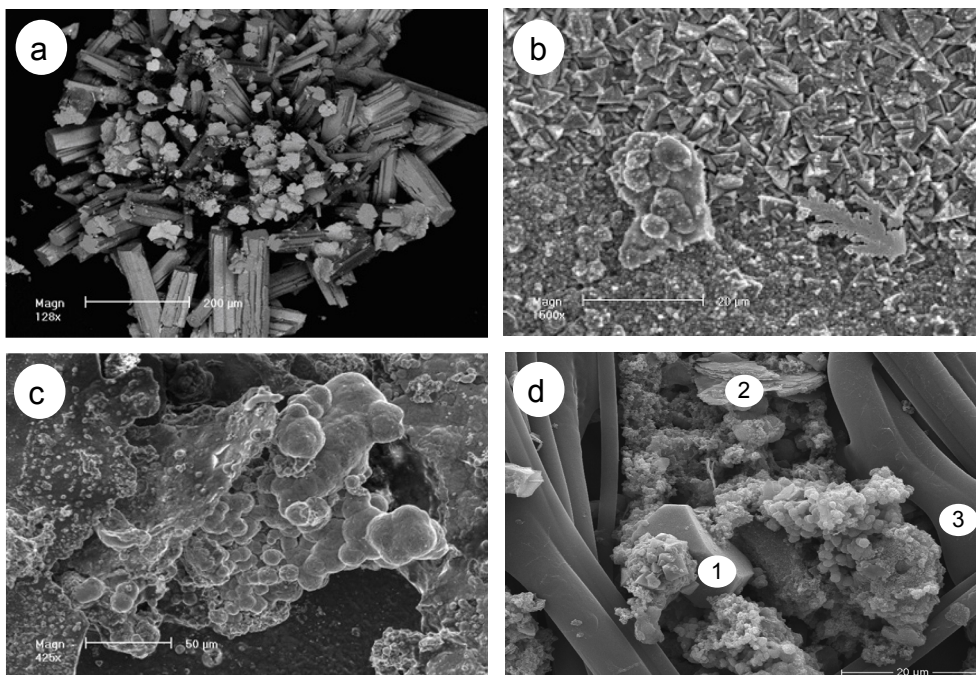
The DOC content was approximately 3.5 mg l<sup>-1</sup>. Small amounts of short-chain organic acids (e.g., acetate and propionate) were detected, ranging between 0.1 mg l<sup>-1</sup> and 1.9 mg l<sup>-1</sup> (Vetter et al. unpublished). The redox potential of less than -50 mV of the fluid represented anoxic, reduced conditions. The total gas content of the fluids amounted to 7 %, while carbon dioxide (86.2 vol.-%) and nitrogen (13.8 vol.-%) were the predominant gases. The hydrogen content of the fluids extracted from the warm and cold well of the aquifer was approximately 0.03 vol.-% and 0.21 vol.-%, respectively, and only trace quantities of methane were detected. Hydrogen sulfide was only detected in fluids extracted from the cold well, with average values of 0.2 vol.-%.



## Mineral precipitates

Reservoir materials mainly consisted of quartz, feldspar, and clay minerals (kaolinite). In fluid produced from the warm well,  $0.001 \text{ g m}^{-3}$  of solids was retained in filters from the topside facility. The majority (80 %) of mineral precipitates in these filters consisted of calcium carbonate crusts (Fig. 3a) and thin crusts of iron sulfides. Accessory minerals included nickel and copper sulfides, chalcopyrite (Fig. 3b), as well as the reservoir materials quartz and clay. After heat extraction at the heat exchanger and cooling of the fluid to approximately  $46^\circ\text{C}$ , the mineral precipitates accumulated in filters at the cold well were dominated by iron sulfide, forming crusts with more than  $100 \mu\text{m}$  in size (Fig. 3c).

Remarkably,  $1 \text{ g m}^{-3}$  of solids was retained in the topside facility filters from the cold well at the beginning of the recharge mode, whereas  $0.01 \text{ g m}^{-3}$  of solids was transported in the production flow at the end of this operation mode after a longer period of fluid production. The comparative high content of solids led to a reduced filter lifetime in the topside facility. The main mineral residue ( $\sim 90 \%$ ) was iron sulfide (FeS), with a particle size of less than  $1 \mu\text{m}$  (Fig. 3d).



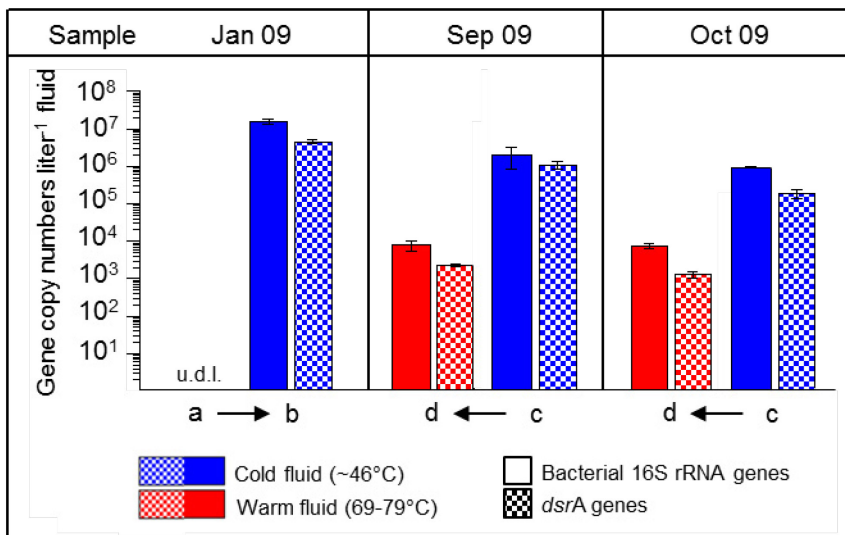
**Fig. 3** SEM images of minerals in filter residues (a) Sticks of calcium carbonate ( $\text{CaCO}_3$ ) and (b) surface of a chalcopyrite ( $\text{CuFeS}_2$ ) crust found in filter residues before heat extraction. (c) Iron sulfide crusts found in filter residues after heat extraction. (d) Idiomorphic iron sulfides (1) with detrital clay minerals (2) found in filter residues before fluid heating, filter fibers (3).

## Ergebnisse

The minority of mineral residues consisted of rust, calcium carbonate, and reservoir materials. After heat supply at the heat exchanger, the mineral precipitates in the topside facility filters from the warm well were also almost exclusively composed of iron sulfide. Scale formation in the aquifer was previously described by Wolfgramm and Seibt (2006) and Obst and Wolfgramm (2010).

### Abundance of bacteria and SRB in geothermal fluids

16S rRNA and *dsrA* gene copy number as a quantitative measure of bacteria and SRB abundance were determined from fluid samples originating from the warm and the cold well (Fig. 4). The total bacterial abundance in fluids produced from the warm well was in the range of detection limit (Fig. 4a); however,  $1 \times 10^6$  gene copies liter<sup>-1</sup> were determined in fluids produced from the cold well (Fig. 4c). Bacterial gene copy number in fluid originating from the warm well and been cooled at the heat exchanger amounted to  $1 \times 10^7$  copies liter<sup>-1</sup> (Fig. 4b). By contrast, in fluid produced from the cold well and heated up at the heat exchanger  $1 \times 10^4$  gene copies liter<sup>-1</sup> were determined (Fig. 4d). The copy numbers of *dsr* genes were up to one order of magnitude lower than the copy numbers of 16S rRNA genes.



**Fig. 4** Abundance of total bacteria and SRB based on the 16S rRNA gene and *dsrA* gene in fluid samples taken from the warm and the cold well of the geothermal plant in January 2009, September 2009, and October 2009 (a) Fluid produced from the warm well. (b) Cooled fluid produced from the warm well. (c) Fluid produced from the cold well. (d) Heated fluid produced from the cold well. u.d.l. under detection limit. → fluid flow

## Ergebnisse

---

Direct cell counting using a Neubauer counting chamber revealed  $4 \times 10^6$  cells ml<sup>-1</sup> in fluids produced from the cold well; while, less than  $10^4$  cells ml<sup>-1</sup> were detected per ml of fluid produced from the warm well.

### **Microbial communities in fluids produced from the warm and cold well**

SSCP analyses revealed complex microbial communities in fluid and filter samples taken at topside facilities from the warm and cold well over a period of two years. The genetic profiles comprised up to 20 bands that differed in abundance and intensity (Fig. 5a - d). No significant differences between the fluid and filter banding patterns were observed (profiles not shown). Therefore, fluid and filter samples were used in parallel for monitoring shifts in the microbial composition.

Sequencing revealed the presence of organisms affiliated to the *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Deferribacteres*, and Alpha-, Beta- and Gamma-*Proteobacteria* which were dominant in the fluid samples produced from the warm well (Fig. 5a and Table 2). The fluid temperatures ranged between 68°C and 73°C during the study period, inducing changes in the microbial composition. In detail, the SSCP genetic profile of a fluid sample taken in March 2008 showed only a few weak bands. However, one band yielded a sequence of satisfactory quality and was affiliated to *Firmicutes* of the genus *Halanaerobium* sp. (band 1). The microbial community in a fluid sample taken after eight month of plant downtime in December 2008 was of greater diversity and five sequences were affiliated to Candidatus *Desulforudis audaxviator* (band 2), *Bacteroidetes* (band 3), *Halobacteroidaceae* (band 4), *Flexistipes sinusarabici* (bands 5, 7), and *Sphingomonas* (band 6) as dominant representatives. In March 2009 the community shifted again resulting in only weak bands. Those sequences were affiliated to microorganisms of the genera *Aquabacterium* (band 8), *Pseudomonas* (bands 9, 10), *Sphingomonas* (band 11), *Acinetobacter* (band 12), and *Bacteroidetes* (band 13). *Sphingomonas* and *Bacteroidetes* were previously detected in December 2008.

In contrast, fluid samples produced from the warm well with temperatures ranging between 68°C to 73°C and subsequently cooled to approximately 46°C showed a completely different microbial composition, which did not vary to the same extent as the warm fluid during monitoring (Fig. 5b). In cooled fluid samples that originated from the warm well and that were taken in February 2008, December 2008, and March 2009, relatives of *Desulfohalobium*

## Ergebnisse

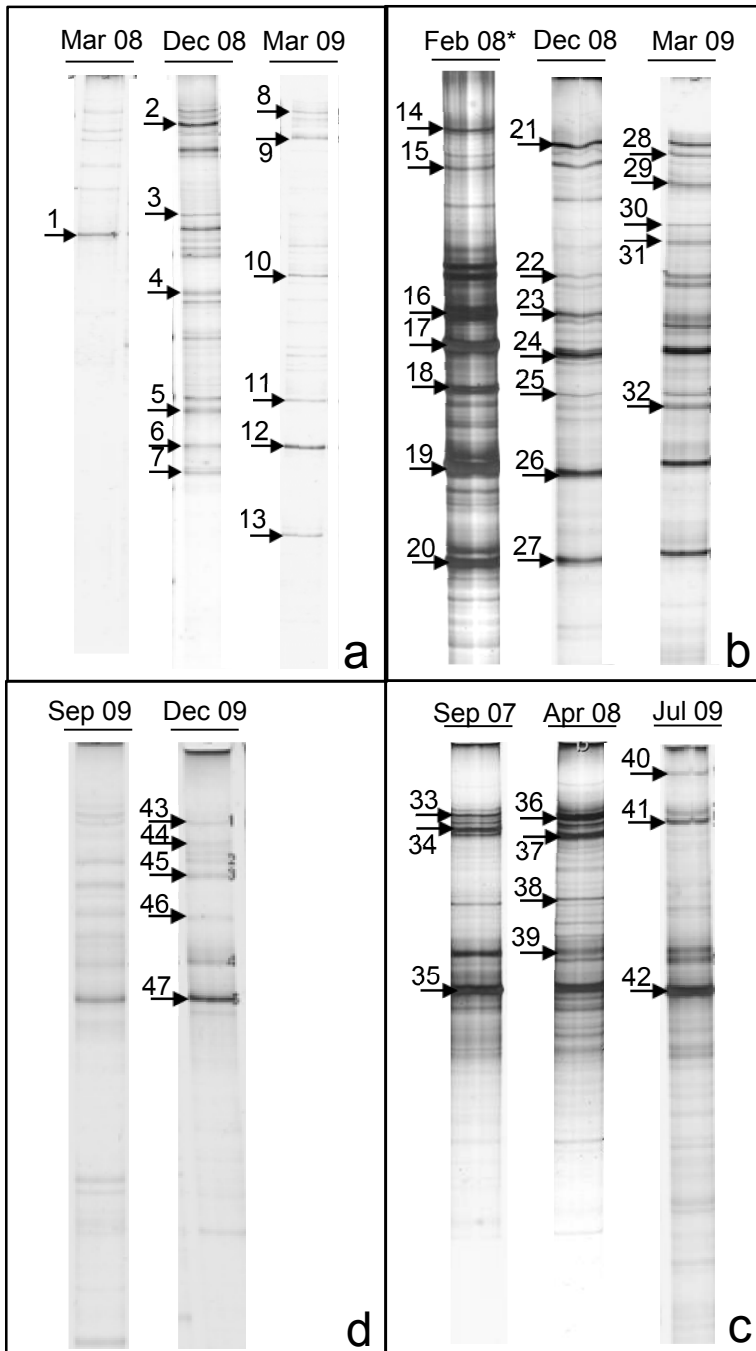
---

*utahense* (bands 14, 21), *Desulfotomaculum* (band 23), *Desulfohalobiaceae* (band 28), *Halanaerobiaceae* (bands 15, 30-32), and *Anaerophaga* species (bands 16-20, 22, 24-27) predominated. In addition, *Halothermothrix orenii* (band 29) was detected in March 2009.

Noticeable, in fluid samples at the same temperatures (46°C) but originating from the cold well, no *Anaerophaga* species were detected. However, *Desulfohalobium utahense* (bands 33, 36, 41), *Desulfohalobiaceae* (band 34), *Desulfotomaculum* (bands 35, 39, 42), Candidatus *Desulforudis audaxviator* (band 37), *Halanaerobiaceae* (band 38), and *Comamonas* sp. (band 40) dominated in the community (Fig. 5c). The genetic fingerprints of fluid samples taken after heating in September and December 2009 and increasing the fluid temperature to 79°C and 74°C, respectively, were quite similar to fingerprinting pattern from the fluid samples taken before heating (Fig. 5c and 5d). Minor differences in profiles were mostly related to weaker bands. Furthermore, *Diaphorobacter* (band 44) and *Pseudomonas* (band 46) species were detected.

Relatives of the sulfate reducing Candidatus *Desulforudis audaxviator* were observed only once in December 2008 in a fluid sample produced from the warm well. In fluids produced from the cold well, different genera of SRB (Candidatus *Desulforudis audaxviator*, *Desulfohalobium utahense*, *Desulfotomaculum* sp.) were always detected using universal primers. The diversity of SRB in fluid samples produced from the cold well was investigated in detail by analyzing *dsrB* gene fragments. Corresponding to the analyses using universal primers, SRB-specific DGGE analysis revealed beside the presence of *Desulfohalobiaceae* and *Desulfotomaculum* relatives additional sulfate reducers related to *Desulfatibacillum* sp. in fluid produced from the cold well (profiles not shown).

## Ergebnisse



**Fig. 5** Comparative SSCP-analysis of 16S rRNA gene fragments using bacterial DNA from fluid and filter (\*) samples taken from sampling devices in the topside facility of the warm and the cold well from September 2007 till December 2009. Due to long-term monitoring, genetic profiles were generated individually for each sample and subsequently arranged. *Arrows* indicate the positions of bands that were sequenced. (a) Fluid produced from the warm well. (b) Cooled fluid produced from the warm well. (c) Fluid produced from the cold well. (d) Heated fluid produced from the cold well

## Ergebnisse

**Table 2** Phylogenetic affiliation of partial bacterial 16S ribosomal RNA gene sequences from SSCP-profiles of fluid and filter samples taken at the warm and the cold well previous and after heat supply and extraction, respectively

Sampling well	Sample	Fluid temperature [°C]	Band	Class	Closest relative, (GenBank Accession Number)	Similarity [%]	GenBank Accession Number	
Fluid produced from the warm well (a)	Mar 08	72.6	1	<i>Firmicutes</i>	<i>Halanaerobium</i> sp. S191 (FJ858788)	98	JQ291307	
			Dec 08	70.7	2		Candidatus <i>Desulforudis audaxviator</i> MP104C (CP000860)	95
	Mar 09	67.6	3	<i>Bacteroidetes</i>	Uncultured <i>Bacteroidetes</i> bacterium clone AS-P4-Sed-67 (FM879134)	98	JQ291309	
			4	<i>Firmicutes</i>	<i>Halobacteroidaceae</i> bacterium Z7100 (HQ828140)	95	JQ291310	
			5, 7	<i>Deferribacteres</i>	<i>Flexistipes sinuarabici</i> DSM 4947 (CP002858)	98, 99	JQ291311, JQ291313	
			6	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Sphingomonas</i> sp. T19 (HQ647266)	99	JQ291312	
			8	<i>Betaproteobacteria</i>	Uncultured <i>Aquabacterium</i> sp. clone I-18 (AF523025)	99	JQ291314	
			9	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Pseudomonas</i> sp. UYSO19 (JF262574)	98	JQ291315	
			10	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Pseudomonas putida</i> strain HTc1 (JF703647)	98	JQ291316	
			11	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Sphingomonas</i> sp. T19 (HQ647266)	97	JQ291317	
			12	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Acinetobacter</i> sp. CmNA3 (HM352317)	99	JQ291318	
			13	<i>Bacteroidetes</i>	<i>Bacteroidetes</i> bacterium WD250 (HQ341748)	98	JQ291319	
			Cooled fluid produced from the warm well (b)	Feb 08	46.2	14	<i>Delta-Proteobacteria</i>	<i>Desulfohalobium utahense</i> strain EtOH3 (DQ067421)
15	<i>Firmicutes</i>	Uncultured <i>Halanaerobiaceae</i> bacterium clone TCB112x (DQ647098)				92	JQ291321	
16	<i>Bacteroidetes</i>	Uncultured <i>Anaerophaga</i> sp. clone TCB200x (DQ647171)				97	JQ291322	
17 - 20	<i>Bacteroidetes</i>	<i>Anaerophaga</i> sp. TC371 (DQ647061)				99, 98, 96, 97	JQ291323 - JQ291326	
Dec 08	46.5	21		<i>Deltaproteobacteria</i>	<i>Desulfohalobium utahense</i> strain EtOH3 (DQ067421)	98	JQ291327	
		22		<i>Bacteroidetes</i>	<i>Anaerophaga thermohalophila</i> strain Fru22 (NR_028963)	99	JQ291328	
		23		<i>Firmicutes</i>	<i>Desulfotomaculum</i> sp. strain NA401 (AJ866942)	89	JQ291329	
		24 - 27		<i>Bacteroidetes</i>	<i>Anaerophaga</i> sp. TC371 (DQ647061)	98, 98, 97, 98	JQ291330 - JQ291333	
Mar 09	48.3	28		<i>Deltaproteobacteria</i>	Uncultured <i>Desulfohalobiaceae</i> bacterium clone J2Dbac (DQ386183)	98	JQ291334	
		29		<i>Firmicutes</i>	<i>Halotheothrix orenii</i> H 168	99	JQ291335	
		30, 31		<i>Firmicutes</i>	Uncultured <i>Halanaerobiaceae</i> bacterium clone L5Dbac (DQ386209)	94, 90	JQ291336, JQ291337	
		32		<i>Firmicutes</i>	Uncultured <i>Halanaerobiaceae</i> bacterium clone TCB112x (DQ647098)	97	JQ291338	
Fluid produced from the cold well (c)	Sep 07	45.9		33	<i>Deltaproteobacteria</i>	<i>Desulfohalobium utahense</i> strain EtOH3 (DQ067421)	98	JQ291339
			34	<i>Deltaproteobacteria</i>	Uncultured <i>Desulfohalobiaceae</i> bacterium clone J2Dbac (DQ386183)	98	JQ291340	
			35	<i>Firmicutes</i>	<i>Desulfotomaculum</i> sp. strain NA401 (AJ866942)	91	JQ291341	
	Apr 08	47.1	36	<i>Deltaproteobacteria</i>	<i>Desulfohalobium utahense</i> strain EtOH3 (DQ067421)	98	JQ291342	
			37		Candidatus <i>Desulforudis audaxviator</i> MP104C (CP000860)	96	JQ291343	
			38	<i>Firmicutes</i>	Uncultured <i>Halanaerobiaceae</i> bacterium clone L5Dbac (DQ386209)	95	JQ291344	
			39	<i>Firmicutes</i>	<i>Desulfotomaculum</i> sp. strain NA401 (AJ866942)	89	JQ291345	
	Jul 09	46.0	40	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Comamonas</i> sp. clone MZ_15 (JF690938)	100	JQ291346	
			41	<i>Deltaproteobacteria</i>	<i>Desulfohalobium utahense</i> strain EtOH3 (DQ067421)	97	JQ291347	
			42	<i>Firmicutes</i>	<i>Desulfotomaculum</i> sp. strain NA401 (AJ866942)	90	JQ291348	
	Heated fluid produced from the cold well (d)	Dec 09	74.0	43	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Comamonas</i> sp. clone TBA7 (FR745409)	98	JQ291349
				44	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Diaphorobacter</i> sp. clone QH-6 (HQ588349)	98	JQ291350
				45		Candidatus <i>Desulforudis audaxviator</i> MP104C (CP000860)	94	JQ291351
46				<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Pseudomonas</i> sp. clone OPS1 (AF368760)	98	JQ291352	
47				<i>Firmicutes</i>	<i>Desulfotomaculum</i> sp. strain NA401 (AJ866942)	85	JQ291353	



### 3.3.5. Discussion

Monitoring of 16S rRNA genes using the genetic fingerprinting technique SSCP proved to be a sensitive method for detecting significantly different microbial composition in the highly saline fluids (total dissolved solids (TDS) 130 g l<sup>-1</sup> - 134 g l<sup>-1</sup>) produced from the warm (68°C - 73°C) and cold side (~ 46°C) of a sandstone aquifer used for geothermal heat storage. Furthermore, dynamic changes in the microbial composition in fluids following fluid heating and cooling processes at the geothermal plant were observed. Real-time PCR and direct microscopic counting were suitable for the examination of higher bacteria and SRB abundances in cold fluids compared with warm fluids. Since quantitative analyses were not done immediately after sampling, gene copy numbers are relatively low; however, data revealed a remarkable trend.

In fluid samples produced from the warm well with temperatures of 68°C - 73°C direct cell counting revealed less than 10<sup>4</sup> cells ml<sup>-1</sup> and sequences affiliated to *Firmicutes* (*Halanaerobium praevalens*), *Bacteroidetes*, *Deferribacteres*, and the Alpha-, Beta-, and Gamma- subclasses of the *Proteobacteria* were detected. Relatives of the sulfate reducing Candidatus *Desulforudis audaxviator* were observed only once in December 2008 in a fluid sample produced from the warm well; however, those sequences probably represent artefacts since the fluid sample was taken after eight months of plant downtime, and relatives of this organism probably originated from fluids pumped from the cold well to the warm well before plant downtime. This assumption bases on the regularly detection of Candidatus *Desulforudis audaxviator* relatives in fluids produced from the cold well. Biofilm formation in piping was probably encouraged due to a gradual drop in fluid temperature during plant downtime, and may have led to growth of species with lower temperature optimum.

Although saline fluid samples were high-tempered with temperatures above 67°C, not all of the bacterial sequences detected in fluids produced from the warm well belong to thermohalophilic microorganisms and are also common in mesophilic non-saline aerobic environments. It may be that the growth of these organisms was encouraged during sample transport or samples were contaminated during handling. However, sequences affiliated to obligate aerobic bacteria such as *Acinetobacter* sp., *Sphingomonas* sp. (Patureau et al. 2000; Ohta et al. 2004), and facultative aerobic bacteria, able to use oxygen or nitrate as electron

## Diskussion

---

acceptors, such as *Aquabacterium* sp. (Kalmbach et al. 1999; Straub et al. 2004), and *Pseudomonas* sp. (Cuypers and Zumft 1993; Drysdale et al. 1999; Bothe et al. 2000) were frequently detected in terrestrial subsurface environments and in the deep subseafloor biosphere (Balkwill 1997; Fry et al. 2008). Even though nitrate was not detected in fluids, the high mass flow rate of  $80 \text{ m}^3 \text{ h}^{-1}$  at the geothermal plant has to be considered, because it may represent a continuous supply of small amounts of nitrate for microbes, preferably organized in biofilms that effectively retain nutrients as typically seen in the deep subsurface and any other aquatic environment (Teske and Stahl 2002).

Remarkably, *Acinetobacter* sp. has been shown to be a pioneer bacterium of biofilms in e.g. corroded gas steel pipelines (Zhu et al. 2003). Thus, *Acinetobacter*-related species probably encouraged the maturation of a biofilm in the piping of the warm well due to specific pili on their cell surface (Harshey et al. 2003) that enable the attachment of cells to the interior pipe surfaces. In addition, one should consider that the organisms identified here by partial sequence similarities are not identical to cultivated species and may have abilities not observed thus far. In addition, adaptations to environmental conditions may result in interplay between salinity and hydrostatic pressure that influences microbial growth and physiology and may partially explain the non-halophilic genera living in saline aquifers (Kaye and Baross 2004).

Heat extraction and decreasing fluid temperature had a significant influence on the microbial composition observed in fluids originating from the warm well. In addition, 16S rRNA gene and *dsrA* gene copy numbers increased 6-fold and 5-fold, respectively, indicating higher cell counts in cooled fluids. Sequences affiliated to three different fermenting organisms (*Halanaerobium*, *Halothermothrix*, *Anaerophaga*) and two genera of SRB (*Desulfohalobium* sp., *Desulfotomaculum* sp.) were detected in fluids cooled at the heat exchanger from 75°C to 46°C. Physiological characteristics of detected SRB and *Halanaerobiaceae* correspond to the subsurface environment with respect to optimum temperature, salt concentration, and pH, and are commonly found in similar anaerobic saline environments such as sediments from salt lakes (Cayol et al. 1994; Jakobsen et al. 2006), geothermal groundwater (Daumas et al. 1988), fracture water (Chivian et al. 2008), as well as in oil fields and petroleum hydrocarbon contaminated sites (Magot et al. 2000; Cayol et al. 2002; Denger et al. 2002; Bonch-Osmolovskaya et al. 2003). Halophilic *Desulfohalobium utahense* are known moderate halophilic and mesophilic sulfate and thiosulfate reducers that use a broad range of electron



## Diskussion

---

donors including various short-chain fatty acids and primary (C<sub>1-5</sub>) alcohols, amino acids, H<sub>2</sub>/acetate and H<sub>2</sub>/yeast extract (Jakobsen et al. 2006). In addition, *Desulfotomaculum* belong to the most frequently isolated SRB in subsurface sediments, including meso- and thermophilic species using hydrogen and a number of organic compounds, such as ethanol, formate, lactate, pyruvate, malate, and succinate, for growth (Parkes and Sass 2007; Muyzer and Stams 2008).

Probably due to heat extraction activation of a dormant microbial population of fermentative bacteria and SRB was favored. Biofilms were likely established on the heat exchanger plates and the downstream piping. Microorganisms and parts of the biofilm were probably detached with the fluid flow as a result of mechanical processes, leading to the observed changes within the microbial community composition. Detected *Desulfotomaculum* are typically endospore-forming (Campbell and Postgate 1965) and also *Anaerophaga thermohalophila* form spore-like structures or spheres in ageing cultures (Denger et al. 2002). Beside fluid temperature, substrate availability is important for stimulating dormant microorganisms. The availability of organic matter thereby depends on physical and chemical parameters, and particularly a rise in temperature increases the availability of organic matter (Kalbitz et al. 2000; Burdige 2007; Hubert et al. 2010). Thus, the temperature increase due to heat storage in the aquifer probably enabled organic matter mobilization in the warm side of the aquifer and supported the growth of fermentative bacteria downstream of the heat exchanger. Activity of fermentative bacteria is indicated by the detection of the volatile fatty acids formate and acetate in fluids, with concentrations ranging between 0.1 mg l<sup>-1</sup> and 1.9 mg l<sup>-1</sup> (Vetter et al. 2012). The impact of aquifer thermal energy storage on organic matter mobilization from aquifer materials was studied by Brons et al. (1991) and Jesušek et al. (2012). Even chemicals used at the topside facility or residues from well construction may serve as energy sources (Hamilton 2003; Klotzbücher et al. 2007; Struchtemeyer et al. 2011). The effect of organic compounds, introduced by drilling and well completion during plant construction that enriched a specific community of fermentative bacteria was also observed for a saline aquifer in the NGB four months after plant startup (Lerm et al. 2011b). The degradation of organic matter catalyzed by fermentative bacteria and SRB through co-operative metabolism is a well-known microbial process in deep subsurface when sulfate is abundant (Lovley and Chapelle 1995; Beech and Gaylarde 1999; Muyzer and Stams 2008).

Despite a similar fluid temperature range of approximately 46°C, different communities of

## Diskussion

---

SRB and fermentative bacteria were detected in cooled fluid samples originating from the warm well and in fluid samples produced from the cold well. Additionally, a higher total cell count of  $4 \times 10^6$  cell ml<sup>-1</sup> was determined in cold fluid compared to warm fluid, as well as higher abundance of bacteria and SRB indicated by 5-fold higher 16S rRNA and *dsrA* gene copy numbers. In fluid samples produced from the cold well, three different SRB (*Desulfohalobium utahense*, *Desulfotomaculum* sp., Candidatus *Desulforudis audaxviator*) and fermenting *Halanaerobiaceae* predominated in the fluid. However, no *Anaerophaga* were identified as in cooled fluids originating from the warm well. In addition, besides *Desulfohalobium* and *Desulfotomaculum*, sequences affiliated to a Candidatus *Desulforudis audaxviator* were frequently detected in fluids produced from the cold well. Sequences of Candidatus *Desulforudis audaxviator* were also found in 60°C tempered fracture water collected from a South African gold mine at a depth of 2.8 km (Chivian et al. 2008). Recently, a study by Alawi et al. (2011) identified sequences similar to Candidatus *Desulforudis audaxviator* in 61°C tempered fluid samples taken after heat extraction in the topside facility of a geothermal plant in the Molasse Basin (Germany). Candidatus *Desulforudis audaxviator* is a rarely detected microorganism so far, whereas it has the ability to subsist as a single species ecosystem that is based on hydrogen originating from radiochemical reactions in deep crustal rocks and sulfate reduction as the dominant electron-accepting process (Lin et al. 2006; Chivian et al. 2008). The repeated detection of sequences affiliated to this species in a saline aquifer of the NGB (TDS 130 g l<sup>-1</sup>) as well as in a low mineralized Malm aquifer of the Molasse Basin (TDS < 1 g l<sup>-1</sup>) indicates that this organism is much more distributed in the deep subsurface than previously assumed and co-existing with other SRB.

Detailed analyses of SRB with specific primers targeting genes encoding *dsrB* revealed besides *Desulfotomaculum* sp. and *Desulfohalobium* sp. only one additional genus of SRB (*Desulfatibacillum* sp.) in fluids produced from the cold well than using universal bacterial primers. Thus, the dominance of SRB in fluids from the cold side of the aquifer is emphasized.

Different microbial composition in cooled fluids produced from the warm side of the aquifer and in fluids produced from the cold well, indicated that the nutrient composition of the fluids probably differed. The concentration of organic matter did not vary significantly between the fluid of the warm and cold well during the study period. However, small differences in DOC concentration may have existed and were not detected due to the relatively low accuracy of

## Diskussion

---

DOC measurements caused by the high salinity. In addition, the mobilization of sedimentary organic matter is difficult to prove. Slight changes of DOC may result in a transport of significant amounts of organic matter from the warm side of the aquifer to the near wellbore area of the colder well due to the high volume of fluids that are exchanged.

Remarkably, significant differences in the concentration of fluid soluble gases were detected. Whereas the dominant gases carbon dioxide (CO<sub>2</sub> appr. 86 vol.-%) and nitrogen (N<sub>2</sub> appr. 14 vol.-%) were likewise in fluids produced from the warm and the cold well, different amounts of hydrogen gas (H<sub>2</sub>), hydrogen sulphide (H<sub>2</sub>S) and methane (CH<sub>4</sub>) were detected. The H<sub>2</sub> content in the gaseous phase of fluids produced from the cold well (0.21 vol.-%) compared with fluids from the warm well (0.03 vol.-%) was significantly higher and may have favored activity of hydrogenotrophic sulfate reducers closely related to *Desulfohalobium* and *Desulfotomaculum*, leading to detectable traces of H<sub>2</sub>S only in fluids produced from the cold well (H<sub>2</sub>S 0.2 vol.-%). Hydrogen sulfide formed by SRB contributes to well souring, corrosion of technical equipment and plugging of reservoirs (Hamilton 1985).

Detection of H<sub>2</sub>S and higher H<sub>2</sub> content in fluids produced from the cold well compared with the warm well coincided with the higher corrosion damage to the submersible pump in the cold well. Thus, H<sub>2</sub> dissolved in fluids produced from the cold well may indicate downhole metal corrosion. Similar inferences were done for a geothermal aquifer (Criaud et al. 1987) and from laboratory corrosion experiments (Reardon 1995). Geothermal fluids with a high mineralization have a high corrosion potential, whereas the chlorine ions in the saline fluid act as catalysts causing continuous metal dissolution. Since corrosion damage was significantly higher in the cold well compared with the warm well this is probably due to ambient temperatures that were favorable for growth of the hydrogenotrophic SRB detected. It is thus likely that SRB detected in fluids produced from the cold well accelerated corrosion at the submersible pump and were most likely involved in or perhaps responsible for the operational failure. *Desulfotomaculum* species often cause corrosive damage to steel structures, such as pipeline systems and storage tanks (Hamilton 1985; Little and Lee 2007). Besides SRB, fermentative *Halanaerobium* were detected in biofilms of corroded pipelines (Neria-Gonzalez et al. 2006). Microbial fermentation, catalyzed by organisms related to *Halanaerobiaceae* may represent a further source of hydrogen. However, due to lower diversity of fermentative bacteria compared with the SRB and low DOC content in fluids, hydrogen release from fermentation processes was probably not that relevant than chemical corrosion.

## Diskussion

---

Besides 16S rRNA gene sequences assigned to SRB, the isotopic signature of the residual sulfate ( $\delta^{34}\text{S}(\text{SO}_4) > 30 \text{ ‰}$ , Möller et al. 2008), a 10 % lower sulfate content in fluids produced from the cold well, and the detection of sulfide precipitates in topside facility filters (Fig. 4) clearly indicate metabolically active SRB. Particularly the higher sulfide content in the filter residues of the cold well compared with the filter residues of the warm well indicate enhanced activity of SRB detected in fluids due to the lower temperature. Beside iron sulfide, copper- and nickel sulfides, and carbonates were detected in filter residues of the geothermal plant indicating mineral formation processes in the fluid due to microbial induced mineralization and pressure-dependent  $\text{CO}_2$ -degassing. Commonly 80 % of the mineral residues in filters were newly created in the thermal water stream and did not represent constituents of the aquifer material (Obst and Wolfgramm 2010). The new formation of minerals was observed in different geothermal plants in Germany; whereas iron sulfides are typical for Mesozoic sandstone aquifers in depths up to 1,800 m with a fluid temperature below  $90^\circ\text{C}$  (Wolfgramm et al. 2011).

The activity of SRB in the well and the near wellbore area over a period of three years probably led to a 10 % lower sulfate concentration of cold well fluids compared with warm well fluids ( $1,000 \text{ mg l}^{-1}$ ). Therefore, the sulfate concentration of fluids produced from the warm well showed a dependence on the operational mode of the plant, corresponding to a 10 % lower sulfate content at the beginning of the discharge period with a rising trend during fluid extraction from the warm well. The increase in the sulfate content with the produced volume from the warm side of the aquifer was probably due to mixing of fluids originating from the outer part of the subsurface heat bubble and rock materials close to the well.

Heating of fluids produced from the cold well did not caused a significant shift in the genetic fingerprinting patterns, as observed for fluids produced from the warm well and cooled due to heat extraction. However, qPCR indicated 2-fold lower abundance of bacteria and SRB in heated fluids compared to fluids upstream of the heat exchanger. Similar banding pattern before and after fluid heating, but weaker band intensities as well as lower 16S rRNA and *dsrA* gene copy numbers downstream of the heat exchanger indicated the heat-induced inactivation and destruction of cells originating from the cold side of the aquifer. Hyperthermophilic microorganisms existing in fluids downstream of the heat exchanger were probably not detected because of lower cell numbers compared to fluids upstream of the heat

## Diskussion

---

exchanger. Obviously, microorganisms in fluids produced from the cold well had been already inactivated due to temperature increase, but were still detected due to the high sensitivity of the genetic fingerprinting caused by PCR amplification of 16S rRNA genes.

The initial state of the microbial composition in the aquifer before well-drilling and start of plant operation could not be characterized because no fluid samples were available before and during plant startup in 2005. It is likely that in the course of plant operation two different microbial communities developed in the periphery of the two wells as a result of temperature shifts in the aquifer that changed the established growth conditions for the abundant microbes, selecting for species adapted to these modified temperature ranges. Other studies investigating the temperature effects on microbial community structure in natural and engineered aquifers that are characterized by high temperature and salinity are extremely rare. However, the effects of temperature decreases in marine oil reservoirs caused by the introduction of sulfate-rich sea-water have been studied in detail. Several studies showed that the injection of sea-water in oil production systems altered the physical and chemical conditions in the reservoir, and favored the growth of mesophilic sea water bacteria, particularly SRB, near the injection well (Sunde and Torsvik 2005; Vance and Thrasher 2005). Subsequently, the activity of SRB caused severe economic problems due to the produced H<sub>2</sub>S, leading to microbiologically influenced corrosion, reservoir souring, and decreasing efficiency of oil production due to plugging by SRB biomass and precipitated metal sulfides. Probably similar processes occurred at the cold well of the investigated geothermal plant due to the injection of cooled geothermal fluids at a temperature below the original aquifer fluid temperature; although the availability of organic matter is considerably lower than in oil reservoirs. Subsequently, the drop in aquifer fluid temperature from 54°C to 46°C and the availability of ferrous iron in the casing probably stimulated the SRB in the aquifer. In accordance to oil production systems, failures in plant operation caused by corrosion and mineral precipitation were observed and the detected SRB were probably causative for. Even if the availability of organic matter in the investigated geothermal aquifer is lower than in fluids of oil reservoirs, inferences between the investigated geothermal aquifer and oilfield reservoirs can be done since commonalities concerning the casing and physico-chemical properties of fluids like temperature, salinity, and sulfate content exist. In addition, sulfate reducers closely related to *Desulfotomaculum* and *Desulfohalobium* are also commonly found in oil reservoirs (Magot et al. 2000; Birkeland

2005; Grigoryan and Voordouw 2008; Gieg et al. 2011) as seen for the saline heat store. Thus, chemical constraints in deep reservoirs select for similar microbial communities, while abundant sulfate reducers lead to the widespread phenomenon of biological sulfide production that adversely affects operational materials in reservoirs or in topside processing facilities.

### 3.3.6. Conclusions

Fluid temperature, increased availability of organic carbon, and hydrogen gas seemed to be the most important environmental factors affecting the composition of the bacterial communities and their activity in the two wells of the heat store. Higher cell counts as well as higher 16S rRNA and *dsrA* gene copy numbers in fluids produced from the cold well of the geothermal plant that was seriously affected by corrosion and precipitation processes indicated that microorganisms were favored by lower fluid temperature and higher availability of hydrogen as an electron donor. Predominance and higher diversity of SRB in the cold well showed that microbial mediated corrosion processes seriously affected the operational reliability of the plant. Geochemical analyses were not sensitive enough to detect slight changes in organics in reservoir and topside conditions caused by plant operation with a high fluid flow. Thus, fermentative bacteria and SRB served as indicators for differences in the chemical conditions in the fluids of the two wells.

### Acknowledgments

We thank the public utilities of the city Neubrandenburg providing access to the topside facility of the heat store. In addition, we thank AMODIA Bioservice GmbH (Braunschweig, Germany) for SSCP analyses and MicroPro GmbH (Gommern, Germany) for MPN counting. In addition, we thank Rickard Lindner for the analyses of the SRB diversity using *dsrB* gene fragments. We are thankful to Alexandra Vetter and Andrea Vieth-Hillebrand for the DOC measurements and the analyses of the dissolved organic acids in the fluid samples. This work was supported by Federal Ministry of the Environment, Natural Conservation and Nuclear Safety (BMU, grant No. 0327634).

## 4. Diskussion

In dieser Doktorarbeit wurden mikrobiologische Untersuchungen an vier geothermischen Anlagen im Norddeutschen Becken durchgeführt und in drei Veröffentlichungen umfassend diskutiert. Im Rahmen der vorliegenden zusammenfassenden Diskussion sollen die in den Prozesswässern der Anlagen vorkommenden mikrobiellen Gemeinschaften charakterisiert und in Bezug zu den unterschiedlichen geochemischen Bedingungen in den Aquiferen und den an zwei Anlagen beobachteten Betriebsstörungen gesetzt werden.

Zu den untersuchten Anlagen gehörten der Wärmespeicher in Rostock und der Kältespeicher in Berlin, die jeweils einen oberflächennahen sandigen Aquifer erschließen sowie die Anlagen in Neuruppin und Neubrandenburg, die tief gelegene Sandstein-Aquifere geothermisch nutzen. Die aus den oberflächennahen (15 m – 25 m bzw. 30 m – 60 m) Aquiferen produzierten Fluide wiesen ursprünglich typische Grundwassertemperaturen von circa 10°C auf und befanden sich damit in einem Bereich, in dem psychrophile Mikroorganismen leben können. Im Zuge der technischen Nutzung der Aquifere als Energiespeicher wurde beim Wärmespeicher in Rostock die Fluidtemperatur in einem Bereich des Aquifers durch Injektion von bis zu 50°C heißem Fluid bis auf 45°C angehoben bzw. beim Kältespeicher am Berliner Reichstag durch Injektion 5°C kalten Fluids bis auf 6°C abgesenkt. Beim Wärmespeicher in Rostock waren daher neben psychrophilen auch mesophile Mikroorganismen im Fluid zu erwarten. Entsprechend dem geothermischen Gradient im Untergrund, lagen die aus den tiefen Aquiferen (1675 m – 1700 m bzw. 1250 m – 1335 m) geförderten Fluide mit Temperaturen von ursprünglich 60°C bzw. 54°C in einem Temperaturbereich, der thermophile Mikroorganismen begünstigt. Bei der Anlage in Neuruppin wurde durch die Entnahme von Wärme die Fluidtemperatur in einem Aquiferbereich auf 50°C abgesenkt. Hingegen kam es bei der Anlage in Neubrandenburg durch die Injektion von bis zu 90°C heißem Fluid zu einer Anhebung der Fluidtemperatur im Aquifer und in einem anderen durch eine Bohrung erschlossenen Bereich zu einer Absenkung der Fluidtemperatur bis auf 45°C.

Während es sich bei den oberflächennahen Aquiferen des Norddeutschen Beckens um schwach mineralisierte Formationswässer handelte ( $\text{TDS} < 1 \text{ g l}^{-1}$ ), waren die Fluide aus den tiefen Aquiferen in Neubrandenburg und Neuruppin auf Grund des bei den Tiefenwässern des Norddeutschen Beckens mit der Tiefe zunehmenden Salzgehaltes hoch mineralisiert ( $\text{TDS } 130 \text{ g l}^{-1}$  bzw.  $200 \text{ g l}^{-1}$ ).



## Diskussion

---

Die Anlagen in Neuruppin und Neubrandenburg stellen auf Grund der hohen Temperaturen und Salinitäten in den Prozesswässern ein Extremhabitat für Organismen dar. Eine Charakterisierung der mikrobiellen Lebensgemeinschaften erweitert daher die Kenntnisse über die unter Extrembedingungen in anthropogen genutzten Habitaten der „Tiefen Biosphäre“ vorkommenden Mikroorganismen.

Die vergleichenden Untersuchungen basierten auf den genetischen Fingerprintingmethoden PCR-SSCP und PCR-DGGE zur Charakterisierung der mikrobiellen Biozöosen in geothermalen Fluiden. Zellzahlen und Zellmorphologien wurden in Proben aus dem Kältespeicher am Berliner Reichstag und dem Wärmespeicher in Neubrandenburg mittels DAPI-Färbung und FISH bestimmt. Zudem wurden für den Wärmespeicher in Neubrandenburg real-time PCR Untersuchungen durchgeführt, um den Einfluss der Fluiderwärmung und –abkühlung auf die Abundanz von *Bacteria* und SRB zu analysieren.

Untersucht wurden Fluid-, Filter- und Sedimentproben, die über einen Zeitraum von bis zu 2,5 Jahren aus dem laufenden Betrieb der Anlagen oder wie bei der Anlage in Neuruppin während einer Tiefenprobennahme genommen wurden. Durch die Analyse von Fluid- und Feststoffproben wurden neben den planktonisch vorkommenden Mikroorganismen auch sessile Mikroorganismen detektiert. Da aus verfahrenstechnischen Gründen bei den Probennahmen nicht immer ein Wechsel der Anlagenfilter erfolgte und bei allen Anlagen durch genetisches Fingerprinting keine signifikanten Unterschiede in der mikrobiellen Zusammensetzung von Fluid- und Filterproben feststellbar waren, wurden im Weiteren überwiegend Fluidproben untersucht. Intensivere Banden in den genetischen Profilen der Filterproben wiesen auf eine Anreicherung von Mikroorganismen in den Filtern hin. Die Fingerprinting-Verfahren waren jedoch ausreichend sensitiv und erlaubten eine Charakterisierung der mikrobiellen Gemeinschaften in den verschiedenen geothermischen Anlagen anhand der aus den Anlagen entnommenen Fluidproben. Über die unterschiedlichen Bandenintensitäten in den genetischen Fingerprints ließen sich semiquantitative Aussagen zu den in den Wässern gleicher chemischer Zusammensetzung dominierenden Mikroorganismen ableiten, sodass eine Abschätzung der Besiedlung der Formations- und Prozesswässern erfolgen konnte.



## Diskussion

---

Mit dem genetischen Fingerprinting konnten in den Prozesswässern der vier geothermischen Anlagen diverse mikrobielle Biozöosen nachgewiesen werden. Ursache für die unterschiedliche Zusammensetzung waren die standortspezifische Temperatur und Salinität in den Aquiferen und die im Fluid verfügbaren Elektronendonatoren und -akzeptoren. Organismen der *Beta-* und *Gammaproteobacteria* wurden in den Prozesswässern aller Anlagen nachgewiesen. Zudem kamen häufig *Alpha-*, *Delta-* und *Epsilonproteobacteria* sowie *Clostridia* und *Bacteroidetes* vor. *Flavobacteria*, *Deferribacteres*, *Verrucomicrobia*, *Chloroflexi* und *Chlorobi* waren nur vereinzelt nachweisbar.

In den aus oberflächennahen Aquiferen produzierten Fluiden wurden Organismen detektiert, die auch in anoxischen Böden sowie in Seen und anderen Grundwasserhabitaten nachweisbar waren (Peduzzi et al. 2003, Newton et al. 2006, Sattley & Madigan 2006, Briée et al. 2007, Hori et al. 2007, Satoh et al. 2007, Johnston et al. 2007, Hartmann et al. 2008, Griebler & Lueders 2009, Mueller-Spitz et al. 2009). Hingegen ähnelten die in den bis zu 63°C heißen salinen Fluiden von Neuruppin und Neubrandenburg detektierten DNA-Sequenzen überwiegend thermophilen und halophilen Mikroorganismen, die in salinen Sedimenten, Ölreservoirs und Aquiferen aus sedimentärem Gestein nachgewiesen wurden (Daffonchio et al. 2006, Kjeldsen et al. 2007, Sette et al. 2007). Dort waren die Mikroorganismen vermutlich am Abbau organischen Materials beteiligt (McMahon & Chapelle 1991, Krumholz et al. 1997) und nutzen in Erdölen enthaltene Kohlenwasserstoffe als Energie- und Kohlenstoffquelle (Atlas 1981, Leahy & Colwell 1990). Für die tiefen salinen Aquifere in Neuruppin und Neubrandenburg zeigte sich auf Grund des gemeinsamen Nachweises von *Alpha-*, *Beta-* und *Deltaproteobacteria* sowie *Clostridia* und *Bacteroidetes* in den Prozesswässern eine vergleichsweise große Übereinstimmung in den phylogenetischen Zuordnungen. Die mikrobiellen Gemeinschaften in tiefen Aquiferen scheinen daher auf Grund der stabileren Umweltbedingungen ähnlicher zusammengesetzt zu sein, als in den oberflächennahen Aquiferen, die durch Oberflächenwasser beeinflusst werden können. Hinweise auf versickerndes Oberflächenwasser gaben im Wärmespeicher Rostock nachgewiesene *Rhodocyclales*, phototrophe *Chloroflexi* und *Chlorobia* (siehe Kapitel 3.1.). Insbesondere scheint die mikrobielle Diversität in den salinen Aquiferen geringer zu sein, als bei den oberflächennahen Aquiferen. Das entspricht dem von Frontier (1985) postulierten ökologischen Prinzip - je extremer die Umweltbedingungen desto geringer die mikrobielle Diversität, das für saline und hoch saline Habitate in zahlreichen Studien belegt wurde

## Diskussion

---

(DasSarma & Arora 2001, Oren 2001, Benlloch et al. 2002) und insbesondere gilt wenn in einem Habitat zugleich eine hohe Salinität und hohe Temperaturen herrschen.

Neben der über genetische Profile erfolgten Identifikation von im Fluid vorhandenen Mikroorganismen, wurde beim Kältespeicher in Berlin und dem Wärmespeicher in Neubrandenburg die Gesamtzellzahl im Fluid bestimmt. Die Zellzahl in den Prozesswässern betrug zwischen  $<10^4$  Zellen  $\text{ml}^{-1}$  bis  $10^6$  Zellen  $\text{ml}^{-1}$ . Im Fluid des Kältespeichers am Berliner Reichstag waren zwischen  $10^5$  Zellen  $\text{ml}^{-1}$  und  $10^6$  Zellen  $\text{ml}^{-1}$  nachweisbar. Hingegen wurden im Fluid der warmen Aquiferseite des Wärmespeichers in Neubrandenburg Zellzahlen von  $<10^4$  Zellen  $\text{ml}^{-1}$  und im Fluid der kalten Aquiferseite  $4 \times 10^6$  Zellen  $\text{ml}^{-1}$  ermittelt. Eine höhere Abundanz von *Bacteria* und SRB in Fluiden der kalten Aquiferseite im Vergleich zur warmen Aquiferseite zeigte sich auch durch eine Quantifizierung der 16S rRNA Gene und der für die dissimilatorische Sulfitreduktase (*dsrA*) kodierenden Gene mit Hilfe der real-time PCR. Zudem wurde deutlich, dass das Erwärmen und Abkühlen von Fluid im Wärmetauscher der Anlage einen signifikanten Einfluss auf die Abundanz von *Bacteria* und SRB hat.

Dabei ist zu beachten, dass die in den Fluiden des Wärmespeichers in Neubrandenburg über direkte Zellzahlbestimmung und real-time PCR ermittelten Abundanzen noch durch weitere Proben von diesem Standort erhärtet werden müssen. Denn die Zellzahlbestimmung in den salinen Fluidproben war auf Grund der Kristallbildung bei der Filtration der Fluidproben schwierig. Zudem wurden die real-time PCR Analysen nicht zeitnah zur Probennahme durchgeführt, wodurch die Genkopienzahlen relativ gering waren, aber dennoch einen eindeutigen Trend zeigten.

Die in den Fluiden der beiden geothermischen Anlagen ermittelten Zellzahlen entsprechen den mikrobiellen Abundanzen in Aquiferen, die mit  $10^2$  bis  $10^6$  Zellen pro  $\text{ml}^{-1}$  Wasser angegeben werden (Goldscheider et al. 2006, Griebler & Lueders, 2009).

Die in den Prozesswässern der vier Anlagen identifizierten Organismen zeichneten sich durch einen chemoheterotrophen oder chemoautotrophen Stoffwechsel aus, wie es für oberflächennahe und tiefe Aquifere typisch ist (Goldscheider et al. 2006, Griebler & Lueders 2009). Eine Korrelation zwischen der Teufe des Aquifers und den von Mikroorganismen genutzten Kohlenstoffverbindungen konnte nicht nachgewiesen werden. Durch die anthropogene Nutzung wurden die Bedingungen in den Aquiferen verändert, wodurch es zu Veränderungen in der mikrobiellen Zusammensetzung kam. So deuten die Ergebnisse darauf hin, dass die Verfügbarkeit an organischen Kohlenstoff in den Wässern zum Einen durch

## Diskussion

---

beim Anlagenbau verwendete organikhaltige Bohrspüllösung (siehe Kapitel 3.1.) und zum Anderen durch die Wärmespeicherung im Aquifer und dem damit verbundenen Temperaturanstieg im Untergrund (siehe Kapitel 3.3.) erhöht wurde. Hinweise darauf gaben erhöhte TOC- und DOC-Gehalte im Sediment und im Fluid kurz nach der Fertigstellung der Anlage in Neuruppin sowie im Fluid nachgewiesene heterotrophe, fermentative Mikroorganismen. Beim Wärmespeicher in Neubrandenburg führte die Injektion von bis zu 90°C heißem Fluid in den Aquifer vermutlich zu einer Mobilisierung sedimentgebundener Organik, wodurch das Wachstum fermentativer Bakterien und SRB im abgekühlten Fluid der Anlage gefördert wurde (siehe Kapitel 3.3.).

Die Umsetzung von in den Fluiden gelösten Schwefel- und Eisenverbindungen spielte in den Biozönosen eine zentrale Rolle. Trotz der unterschiedlichen Sulfatkonzentrationen und Redoxbedingungen in den Prozesswässern wurden bei allen vier Anlagen SRB und als Beleg für deren Aktivität sulfidische Ausfällungen in den Filtern nachgewiesen. So fand in den mit 230 mg l<sup>-1</sup> bzw. 200 mg l<sup>-1</sup> vergleichsweise sulfatarmen Prozesswässern der Anlagen in Rostock und am Berliner Reichstag trotz der in den Fluiden ermittelten Redoxpotentiale (SHE) von 90 - 143 mV bzw. 40 - 80 mV genauso Sulfatreduktion statt, wie in den Anlagen in Neuruppin und Neubrandenburg, bei denen in den sulfatreichen Prozesswässern (SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> 3100 mg l<sup>-1</sup> bzw. 1000 mg l<sup>-1</sup>) reduzierendere Redoxbedingungen ermittelt wurden (SHE -58 mV bzw. -50 mV), die Sulfatreduktion eher erlauben.

Mikroorganismen waren neben der Bildung von sulfidischen Ausfällungen vermutlich auch an der Bildung von Eisenhydroxiden beteiligt, die in den Filtern des Wärmespeichers in Rostock und des Kältespeichers am Berliner Reichstag gefunden wurden. So haben sehr wahrscheinlich Eisenoxidierer, wie im Kältespeicher nachgewiesene Vertreter der Gattung *Gallionella* zur Bildung der Eisenhydroxide geführt.

Da die Sulfatreduktion und die Eisenoxidation unter unterschiedlichen Redoxbedingungen ablaufen, deuteten die Ausfällungen auf in den Porenräumen des Gesteins existierende Mikrohabitate oder auf Anlagenteilen gebildete Biofilme mit graduellen Redoxzonen hin. Mikrobiell induzierte Mineralbildung führte beim Wärmespeicher in Neubrandenburg und dem Kältespeicher am Berliner Reichstag zu Betriebsstörungen. Während die massive Ansammlung von Eisenhydroxiden in den Filterschlitzten der Bohrungen des Kältespeichers Verockerungen und damit Injektionsprobleme hervorrief (siehe Kapitel 3.1.), behinderten auf

## Diskussion

---

der kalten Seite des Wärmespeichers gebildete Eisensulfide ebenfalls die Injektion des Fluids in den Aquifer (siehe Kapitel 3.3.). Die durch Mikroorganismen induzierte Bildung von Eisenhydroxiden und Eisensulfiden ist in natürlichen Aquiferen und technisch genutzten Grundwassersystemen weit verbreitet (van Beek 1989, Park et al. 2006, Cullimore 2007) und kann auch dort zu Problemen führen, indem Bohrlochfilter und das Gestein im bohrlochnahen Bereich durch die Ausfällungen zugesetzt werden. Ausfällungen können sich sogar in einiger Entfernung von der Bohrung im Aquifer befinden (Houben & Weihe 2010). Einerseits könnten die im Bohrloch gebildeten Ausfällungen durch das injizierte Fluid im Aquifer verteilt werden, andererseits könnten aber auch im Bohrloch befindliche Biofilme in das umgebende Gestein des Aquifers gewachsen sein und Mikroorganismen dort zur Bildung mineralischer Ausfällungen geführt haben. Die radiale Ausbreitung von Biofilmen vom Brunnenfilter in das umliegende Gestein ist durch Cullimore (2007) detailliert beschrieben. Zur Entfernung der Ausfällungen reicht daher oft die alleinige mechanische Reinigung der Bohrung nicht aus. Stattdessen müssen oxidative Chemikalien eingesetzt werden, die über den bohrlochnahen Bereich hinaus in das umgebende Gestein eindringen. Brunnenregenerationen mit chemischen und mechanischen Mitteln wurden am Kältespeicher des Berliner Reichstags durchgeführt und stellten die notwendige Injektivität wieder her. Das Zusetzen von Bohrungen durch mineralische Ausfällungen und Mikroorganismen kann verlangsamt werden, indem kontinuierlich Wasser gefördert wird (van Beek 1989). Durch eine kontinuierliche Fluidförderung findet ein steter Abtransport von Mikroorganismen und gebildeten Ausfällungen statt, weswegen Stillstandszeiten an den Anlagen vermieden werden sollten.

Biofilme bildeten sich vermutlich nicht nur in den bohrlochnahen Bereichen, sondern auch in den obertägigen Filtern der Anlagen. Dass die Biofilmbildung in den obertägigen Filter sehr massiv sein kann und dadurch ebenfalls Injektionsprobleme verursacht, wurde am Kältespeicher am Berliner Reichstag deutlich (siehe Kapitel 3.2.). Die Filter der obertägigen Anlage besaßen Maschenweiten von 10  $\mu\text{m}$  und 50  $\mu\text{m}$  und wurden regulär im Durchschnitt nach 2-3 Monaten ausgetauscht, da sich durch die Akkumulierung von Feststoffen und Organismen die Filter zusetzten und die Durchlässigkeit sank. Im Jahr 2008 kam es in Folge schnell zugesetzter Filter zu Injektionsproblemen und dadurch zu Betriebsstörungen in der Anlage. So waren die Filter der obertägigen Anlage in dieser Phase bereits nach zwei Wochen zugesetzt und die Nutzdauer der Filter damit gegenüber dem Normalbetrieb um das 7-fache

## Diskussion

---

reduziert. Mit dem genetischen Fingerprinting konnten Vertreter der Gattung *Thiothrix* in den Filtern nachgewiesen werden. Filamentöse Strukturen, wie sie für die schwefeloxidierenden *Thiothrix* bekannt sind, wurden auch durch rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen und DAPI-Färbung detektiert. Zudem konnten nachträglich Vertreter der Gattung *Thiothrix* durch FISH mit spezifischen Oligonukleotiden (G123T/G123T-C, Kanagawa et al. 2000) nachgewiesen werden. Da Organismen der Gattung *Thiothrix* durch ein Geflecht an Filamenten Rosetten bilden und zu intensiver Biofilmbildung neigen (Brigmon & de Ridder 1998), waren sie vermutlich für das schnelle Zusetzen der obertägigen Filter des Kältespeichers verantwortlich und behinderten die Injektion des Fluids in den Aquifer. Organismen der Gattung *Thiothrix* sind in Grund- und Trinkwasser haltigen Systemen weit verbreitet und rufen in Wasserbehältern, Bewässerungssystemen der Landwirtschaft sowie in den Filtern von Abfüllanlagen von Quellwasser durch intensive Biofilmbildung Biofouling hervor (Ford & Tucker 1975, Brigmon et al. 1997, 2003). Die Ursachen für das plötzliche massive Wachstum von *Thiothrix* sind bisher noch unklar. Möglicherweise kam es zu Veränderungen in der chemischen Zusammensetzung der Fluide. Im Besonderen könnte eine erhöhte Verfügbarkeit an Elektronenakzeptoren eine Rolle gespielt haben. Die Konzentration an Elektronenakzeptoren könnte dadurch erhöht worden sein, dass es im Zuge der in der Umgebung des Berliner Reichstags stattfindenden Bauarbeiten zu Maßnahmen in der Grundwasserregulierung kam. Diese könnten zu einem Eindringen von Grundwasser aus der Umgebung in den geothermisch genutzten Aquiferbereich geführt haben. Veränderungen in der chemischen Zusammensetzung der Fluide konnten in den monatlich genommenen Proben jedoch nicht mit chemischen Analysen nachgewiesen werden. Möglicherweise erfolgte der Eintrag von Umgebungswasser nur kurzfristig. Da einige Mikroorganismen stoffwechselrelevante Substanzen intrazellulär speichern können, erzielen sie bei einer nur kurzzeitig erhöhten Verfügbarkeit von Verbindungen gegenüber anderen Mikroorganismen, die hierzu nicht in der Lage sind, dadurch einen Wachstumsvorteil, indem sie die gespeicherten Verbindungen über einen längeren Zeitraum verstoffwechseln. Schwefeloxidierer wie *Beggiatoa*, *Thioploca* und *Thiomargarita* können beispielsweise große Mengen an Nitrat in Vakuolen speichern, wodurch sie in anoxischen Habitaten in Abwesenheit von Elektronenakzeptoren über mehrere Stunden bis wenige Monate stoffwechselphysiologisch aktiv sein können (Fossing et al. 1995, McHatton et al. 1996, Schulz et al. 1999, Kalanetra et al. 2004). In den bisher charakterisierten Arten der Gattung

## Diskussion

---

*Thiothrix* wurden jedoch keine Vakuolen nachgewiesen. Dennoch könnten ähnliche Prozesse eine Rolle gespielt und die Vermehrung von *Thiothrix*-Vertretern in den obertägigen Filtern begünstigt haben.

Biofilme bildeten sich vermutlich auch in der Verrohrung der Anlagen. So waren im abgekühlten Fluid des Wärmespeichers in Neubrandenburg nachgewiesene Vertreter fermentativer Organismen, wie *Halanaerobium*, *Anaerophaga*, *Halothermothrix* und SRB der Gattungen *Desulfohalobium* und *Desulfotomaculum* vermutlich in Biofilmen assoziiert, die sich im Wärmetauscher und in der nachfolgenden Verrohrung gebildet hatten, wobei die fermentativen Bakterien durch auf der warmen Aquiferseite mobilisierte Organik mit Nährstoffen versorgt wurden. In den Fluiden nachgewiesene kurzkettige organische Säuren, wie Acetat und Propionat (Vetter et al. 2012) sind Beleg für die Aktivität fermentativer Bakterien.

Hinweise auf in der Anlage gebildete Biofilme lieferte die trotz der kurzen Aufenthaltszeit der Fluide im Wärmetauscher, unterschiedliche mikrobielle Zusammensetzung in den Fluiden vor und nach der Temperaturreduktion. Durch die Fluidströmung wurden vermutlich Mikroorganismen und Teile von Biofilmen abgetragen, die sich in der Verrohrung nach dem Wärmetauscher gebildet hatten, und konnten dadurch im Fluid nachgewiesen werden. Möglicherweise fanden zwischen den wasserstofffreisetzenden Fermentierern und den wasserstoffzehrenden SRB syntrophe Prozesse statt und begünstigten deren Wachstum. Eine Studie zeigte, dass zwei in einem Ölreservoir nachgewiesene *Halanaerobium* Spezies schneller und effizienter Glycerol fermentieren, wenn sie in Co-Kultur mit hydrogenotrophen SRB, wie *Desulfohalobium retbaense* wachsen (Cayol et al. 2002). Vertreter beider Gattungen wurden in den abgekühlten Prozesswässern des Wärmespeichers nachgewiesen.

Die DOC-Konzentrationen unterschieden sich nicht signifikant zwischen den aus der warmen und der kalten Aquiferseite geförderten Fluiden und deuteten damit auf den mikrobiellen Abbau der Organik hin. Dennoch könnten geringe Unterschiede in den DOC-Konzentrationen existiert haben, die jedoch auf Grund der durch die hohe Salinität geringeren Genauigkeit der DOC-Bestimmung nicht detektiert wurden. Die Mobilisierung von Organik auf der warmen Aquiferseite ist schwierig zu belegen. Ein geringer Unterschied in der DOC-Konzentration könnte zu einer signifikanten Menge an Organik geführt haben, die von der warmen zur kalten Bohrung transportiert wurde, jedoch aufgrund der hohen Fließrate in der Anlage (80 m<sup>3</sup>) nicht detektierbar war.

## Diskussion

---

Die in Fluiden der kalten Aquiferseite (46°C) nachgewiesenen SRB (*Desulfotomaculum* sp., *Desulfobalobium* sp., Candidatus *Desulforudis audaxviator*) waren neben der Bildung sulfidischer Ausfällungen in den obertägigen Filtern und im bohrlochnahen Bereich vermutlich auch an Korrosionsprozessen an der Pumpe in der kalten Bohrung beteiligt. In Folge der Korrosionsprozesse kam es zum Pumpenausfall und einem 8-monatigen Stillstand der Anlage. Neben dem Nachweis von SRB über das genetische Fingerprinting gaben verschiedene chemische Parameter, wie die Isotopie des Sulfats ( $\delta^{34}\text{S}(\text{SO}_4^{2-}) > 30 \text{ ‰}$ ), ein im Vergleich zur Bohrung auf der warmen Aquiferseite 10 % geringerer Sulfatgehalt im Fluid der kalten Bohrung und im Fluid gelöster Schwefelwasserstoff (2000 ppm) Hinweise auf stoffwechselaktive SRB in der kalten Bohrung. Wahrscheinlich förderten in der Bohrung stattfindende chemische Korrosionsprozesse und der dabei freigesetzte Wasserstoff (2100 ppm) das Wachstum von SRB. Vermutlich wurden dabei insbesondere hydrogenotrophe SRB, wie die nachgewiesenen Vertreter von *Desulfobalobium*, *Desulfotomaculum* und Candidatus *Desulforudis audaxviator* gefördert, zumal Wasserstoff deutlich leichter in Biofilme diffundiert als Acetat (Cussler 1984) und bei der Umsetzung von Sulfat mit Wasserstoff 3-mal mehr Energie freigesetzt wird, als bei der an Acetat gekoppelten Sulfatreduktion (Oren 2001). Die Freisetzung von Wasserstoff durch fermentative Organismen spielte gegenüber der chemischen Korrosion auf Grund der im Vergleich zu den SRB geringen Diversität an Fermentierern und dem relativ geringen DOC-Gehalt im Fluid vermutlich eine untergeordnete Rolle.

Auch wenn in den Prozesswässern der drei anderen Anlagen SRB nachgewiesen wurden, traten bei keiner Anlage vergleichbare Probleme durch Korrosion auf. Neben den ohnehin korrosiven Eigenschaften des durch NaCl dominierten Fluids in Neubrandenburg waren die Temperaturbedingungen auf der kalten Aquiferseite anscheinend für SRB so günstig, dass sie in der mikrobiellen Biozönose dominierten und die in der Bohrung stattfindende chemische Korrosion verstärkten. Geeignete Gegenmaßnahmen könnten langfristig die Auswirkungen von Korrosion an der Anlage reduzieren. Die Aktivität von SRB könnte beispielsweise durch die Injektion von Nitrat in die von Korrosion betroffene kalte Bohrung eingeschränkt werden. Durch Nitrat wird das Redoxpotential angehoben (Allen 1949) und nitratreduzierende Bakterien erlangen durch die höhere Energieausbeute einen Wachstumsvorteil gegenüber SRB. Daraus resultierend könnten nitratreduzierende Bakterien die SRB verdrängen, wodurch



## Diskussion

---

das Ausmaß mikrobiell induzierter Korrosion minimiert werden würde (Larsen 2002, Hubert & Voordouw 2007). Desweiteren könnte ein Temperaturregime, bei dem die Fluidtemperatur in der kalten Bohrung temporär über dem für die vorhandenen SRB günstigen Temperaturbereich liegt, deren Wachstum hemmen. Unter Berücksichtigung möglicher chemischer und mineralogischer Prozesse (z.B. Silikatlösung in der warmen Bohrung und Silikatausfällung in der kalten Bohrung, die es hierbei zu vermeiden gilt) würden dann höher temperierte Fluide im Aquifer gespeichert und weniger stark abgekühlte Fluide in die kalte Aquiferseite injiziert werden.

Die Ergebnisse zeigen, dass Mikroorganismen, wie *Gallionella* und *Thiothrix* sowie fermentative Bakterien und SRB Bioindikatoren für die Bedingungen und Prozesse in den verschiedenen geothermischen Aquiferen sind. So konnten über den Nachweis dieser Mikroorganismen Aussagen zu den in den Bohrungen und den obertägigen Anlagen stattfindenden Prozessen gemacht werden. Im Besonderen wiesen die in den Prozesswässern identifizierten Indikatororganismen auf die durch die anthropogene Nutzung der Aquifere hervorgerufenen Veränderungen in den Ökosystemen hin. So waren fermentative Bakterien ein Indikator für den Eintrag von Organik und die temperaturinduzierte Mobilisierung organischen Materials im Aquifer. Darüber hinaus konnten die Ursachen für die durch Ausfällungen, Biofilme und Korrosion hervorgerufenen Betriebsstörungen anhand der Indikatororganismen *Gallionella*, *Thiothrix* und verschiedenen SRB abgeleitet werden. Die Organismen stehen dabei vermutlich selbst in direktem Zusammenhang zu den Prozessstörungen und waren daran beteiligt bzw. dafür ursächlich.

Bioindikatoren werden häufig für Untersuchungen an Ökosystemen verwendet und erlauben Aussagen über den Zustand und die Eigenschaften aquatischer und terrestrischer Habitate. So kann beispielsweise die Bodenqualität über Indikatororganismen bestimmt und der Abbau von Kontaminationen im Boden dokumentiert werden (Avidano et al. 2005). Da Mikroorganismen im Vergleich zu höheren Lebewesen kurze Generationszeiten besitzen, können sie schnell auf Umweltveränderungen reagieren und sind daher effektive Indikatoren. Mikrobielle Indikatoren repräsentieren dabei die Eigenschaften des Habitats und verdeutlichen die Einflüsse auf das Habitat, parallel zum gemessenen oder beobachteten Parameter (Nielsen et al. 2002).



## 5. Zusammenfassung

In dieser Doktorarbeit wurden die mikrobiellen Gemeinschaften in vier geothermischen Anlagen des Norddeutschen Beckens charakterisiert und die Bedeutung mikrobiologischer und geochemischer Prozesse für die Betriebssicherheit geothermischer Anlagen beschrieben.

- Genetische Fingerprintingverfahren, wie PCR-SSCP oder PCR-DGGE waren geeignet, um vielfältige bakterielle Gemeinschaften in Fluiden und Feststoffen aus geothermischen Anlagen nachzuweisen. Zu den in den Prozesswässern der geothermischen Anlagen in Rostock, Neuruppin, Berlin und Neubrandenburg dominant vorkommenden Organismen gehörten Vertreter der *Proteobacteria*, *Clostridia* und *Bacteroidetes*. *Flavobacteria*, *Deferribacteres*, *Verrucomicrobia*, *Chloroflexi* und *Chlorobi* waren nur vereinzelt nachweisbar. Gelegentlich wurden Sequenzen bisher unkultivierten Bakterien zugeordnet, wodurch noch keine Aussagen zu Stoffwechselprozessen möglich waren.
- Die mikrobielle Zusammensetzung in den Fluiden der verschiedenen geothermischen Anlagen wurde signifikant durch lokale physiko-chemische Bedingungen, wie Temperatur, Salinität und im Fluid gelöste anorganische und organische Bestandteile beeinflusst. Die Verfügbarkeit an gelöstem organischen Material wurde bei der geothermischen Anlage in Neuruppin vermutlich durch aus dem Brunnenausbau stammende organische Rückstände (Methylcellulose) beeinflusst. Zudem führte beim Wärmespeicher in Neubrandenburg die Erhöhung der Fluidtemperatur im Aquifer möglicherweise zu einer Mobilisierung sedimentgebundener Organik. In den Prozesswässern beider Anlagen nachgewiesene heterotrophe und fermentative Mikroorganismen wurden wahrscheinlich dadurch gefördert und katalysierten den Abbau des organischen Materials. In den Prozesswässern der vier Anlagen wurden vereinzelt auch autotrophe Mikroorganismen nachgewiesen, wie es für Grundwassersysteme typisch ist.
- In den Prozessfluiden des Kältespeichers in Berlin und dem Wärmespeicher in Neubrandenburg wurden trotz der unterschiedlichen chemisch-physikalischen

## Zusammenfassung

---

Eigenschaften der Aquifere ähnliche Zellzahlen, in Größenordnungen von  $< 10^4$  Zellen  $\text{ml}^{-1}$  bis  $10^6$  Zellen  $\text{ml}^{-1}$  detektiert. Über eine Quantifizierung von 16S rRNA Genen und der für die dissimilatorische Sulfitreduktase (*dsrA*) kodierenden Gene mit Hilfe der real-time PCR wurde für den Wärmespeicher in Neubrandenburg eine höhere Abundanz von *Bacteria* und SRB in Fluiden der kalten Aquiferseite ( $4 \times 10^6$  Zellen  $\text{ml}^{-1}$ ) im Vergleich zur warmen Aquiferseite ( $< 10^4$  Zellen  $\text{ml}^{-1}$ ) nachgewiesen. Zudem wurde deutlich, dass das Erwärmen und Abkühlen von Fluid im Wärmetauscher der Anlage einen signifikanten Einfluss auf die Abundanz von *Bacteria* und SRB hat.

- Zwischen den in den Prozesswässern vorhandenen Mikroorganismen, dem Betrieb der geothermischen Anlagen und dem Aquifer fanden komplexe Wechselwirkungen statt. So beeinträchtigten vermutlich mikrobiell katalysierte Redoxprozesse des Eisen- und Schwefelkreislaufs den Betrieb der geothermischen Anlage am Berliner Reichstag und in Neubrandenburg. Im Prozesswasser des Kältespeichers am Berliner Reichstag nachgewiesene Eisenoxidierer (*Gallionella* sp.) riefen Betriebsstörungen durch Eisenhydroxid-Ausfällungen in den Filterschlitzten der Bohrungen hervor. Zudem wurde die Injektivität durch von Schwefeloxidierern (*Thiothrix* sp.) in den obertägigen Filtern gebildete Biofilme drastisch reduziert. Im Prozesswasser des Wärmespeichers in Neubrandenburg nachgewiesene Sulfatreduzierer waren vermutlich für die Bildung von Eisensulfid-Ausfällungen im Filter- und bohrlochnahen Bereich verantwortlich und verstärkten Korrosionsprozesse an der Pumpe im Bohrloch der kalten Aquiferseite.
- In den Filtern der obertägigen Anlagen und im Bohrloch nachgewiesene Eisenhydroxide und Eisensulfide waren Belege für in den Prozesswässern nachgewiesene Eisenoxidierer und SRB. Im Besonderen wurde dadurch deutlich, dass in den Filter der obertägigen Anlage nicht nur ein Rückhalt an Feststoffen und Mikroorganismen erfolgte, sondern sich bevorzugt dort Biofilme bilden konnten und im Fluid gelöste Nährstoffe zurückgehalten wurden. Die Co-Existenz von Eisen- und Schwefeloxidierenden Mikroorganismen und SRB im Kältespeicher des Berliner Reichstags weist auf in Biofilmen existierende Mikrohabitate mit graduellen Redoxzonen hin.

## Zusammenfassung

---

- Bei den Anlagen am Berliner Reichstag und in Neubrandenburg wurden sogenannte Indikatororganismen identifiziert. Anhand dieser Organismen wurden Veränderungen im Habitat und Prozessstörungen in der geothermischen Anlage angezeigt und konnten mögliche Ursachen dafür abgeleitet werden. Zu den Indikatororganismen gehören im Kältespeicher des Berliner Reichstags nachgewiesene Vertreter der Gattungen *Gallionella* und *Thiothrix*. Das plötzliche massive Auftreten von *Thiothrix* weist im Besonderen auf eine kurzfristig erhöhte Verfügbarkeit von Elektronenakzeptoren wie Nitrat hin. So wurde die Nitratkonzentration möglicherweise durch in den Aquifer eingedrungenes Sicker- und Umgebungswasser kurzfristig erhöht. Zu den am Wärmespeicher in Neubrandenburg nachgewiesenen Indikatororganismen gehörten einerseits fermentative Bakterien (*Halaneraerobium* sp., *Anaerophaga* sp.), deren Wachstum vermutlich durch auf der warmen Aquiferseite mobilisierte Organik begünstigt wurde, und andererseits hydrogenotrophe SRB (*Desulfohalobium* sp., *Desulfotomaculum* sp., *Candidatus Desulforudis audaxviator*), die ein Indikator für im Bohrloch stattfindende chemische Korrosion sind und die Korrosion noch verstärkt haben könnten.
- Für Geothermieanlagen, in denen Eisenhydroxidausfällungen in Filterschlitzten der Bohrungen zu Betriebsstörungen führen, bietet sich eine regelmäßige oder bedarfsorientierte Regeneration der Brunnen an. Biofilme und Ausfällungen werden dadurch weitgehend entfernt und die reguläre Injektionsrate wieder erreicht. Bei Anlagen, die Probleme durch Eisensulfidausfällungen und Korrosion haben, könnte das Wachstum von SRB durch die Injektion von Nitrat und Änderungen im Temperaturregime reduziert werden.

### 6. Ausblick

Um den Betrieb geothermischer Anlagen langfristig weniger anfällig für Störungen durch Ausfällungen und Korrosion zu machen, sollten neben dem Einsatz von alternativen Elektronenakzeptoren für Mikroorganismen (z.B. Nitrat) und Veränderungen im Temperaturregime der Anlage verschiedene Inhibitoren getestet werden, mit denen gezielt biogeochemische Reaktionen in den Prozesswässern und dem bohrlochnahen Bereich beeinflusst werden. Auch wenn Stillstandsphasen an den Anlagen prinzipiell vermieden werden sollten, sind die in einer solchen Phase v. a. im bohrlochnahen Bereich ablaufenden Prozesse genauer zu untersuchen. Beim Wärmespeicher in Neubrandenburg wurde beobachtet, dass es im Zuge eines Anlagenstillstands zu Veränderungen in der mikrobiellen Zusammensetzung der Biozönosen und zu erhöhten Feststofffrachten kam, wodurch sich die Filter nach dem Anfahren der Anlage in Neubrandenburg häufig schnell zusetzten. Die qualitativen und quantitativen Veränderungen in den mikrobiellen Gemeinschaften könnten mit genetischen Fingerprinting Verfahren zur Identifikation von Mikroorganismen und quantitativen Methoden wie real-time PCR und FISH (Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung) erfasst werden.

Die bisherigen Untersuchungen zeigten, dass für die Zellzahlbestimmung in Fluidproben mit einer hohen Salinität noch Optimierungsbedarf besteht. Methodisch sind daher Modifikationen notwendig und alternative Methoden wie real-time PCR sollten v.a. für saline Fluide getestet werden, damit neben der Gesamtzellzahl in den untersuchten Proben, auch die Zellzahl spezifischer Stoffwechselltypen (z. B. SRB) und damit deren Anteil an der Gesamtpopulation bestimmt werden kann. Denn in Analogie zu der, in den obertägigen Filtern vermuteten Biofilmbildung, könnte die Zellzahl sedimentgebundener Mikroorganismen im Bohrloch deutlich höher sein und sich in Stillstandsphasen negativ auswirken.

Darüberhinaus ist die Abundanz und die Diversität von Archaea, speziell den methanogenen Archaea in geothermalen Fluiden zu untersuchen. In den Fluiden der salinen Aquifere in Neuruppin und Neubrandenburg ließen sich Spuren von Methan nachweisen. Der Nachweis an Methan deutet auf methanogene Archaea in den Fluiden hin, zumal in einer Filterprobe

## Ausblick

---

des Wärmespeichers in Neubrandenburg bereits eine Sequenz eines unkultivierten Archaeon gefunden wurde.

## 7. Danksagung

Mit der Fertigstellung meiner Doktorarbeit ist einer Reihe von Personen zu danken, die mich begleitet und unterstützt haben.

Besonderer Dank gilt zunächst Frau Dr.-Ing. Hilke Würdemann vom Helmholtz Zentrum Potsdam – Deutsches GeoForschungsZentrum GFZ für die Vergabe des interessanten Promotionsthemas, für die wissenschaftliche Betreuung meiner Doktorarbeit und die vielen kritischen wie inspirierenden Fachdiskussionen.

Mein Dank gilt auch meinem Doktorvater, Herrn Prof. em. Dr. Ingo Schneider, für die wissenschaftliche Begleitung meiner Arbeit. Durch ihn wurde bereits während meines Studiums an der Universität Potsdam mein Interesse für die mikrobiellen Prozesse in unterschiedlichen Lebensräumen geweckt.

Besonderer Dank gebührt auch Kerstin Rauppach und Dr. Markus Wolfgramm (beide Geothermie Neubrandenburg, GTN) sowie Dr. Andrea Seibt (Boden Wasser Gesundheit GbR, BWG) für die mineralogischen Untersuchungen, den Gasmessungen an den Fluiden und für die Bestimmung der in den Fluiden gelösten anorganischen Komponenten. Dr. Rona Miethling-Graff (GFZ) und Dr.-Ing. Hilke Würdemann möchte ich für Ihre Unterstützung bei der Erstellung der Veröffentlichungen danken.

Bedanken möchte ich mich auch bei meinen Kollegen Dr. Anne Kleyböcker, Marietta Liebrich, Dr. Hannah Halm und Dr. Dominik Neumann für die kritische Durchsicht der Arbeit. Des Weiteren danke ich Anke Westphal für die Untersuchungen mit der real-time PCR, Dr. Daria Morozova für die Einführung in die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) und Dr. Mashal Alawi (GFZ) für seine Unterstützung bei den DGGE-Analysen und den DNA-Sequenzanalysen.

Letztlich möchte ich auch meiner Familie danken, die mich sowohl während meines Studiums als auch während meiner Doktorarbeit in jeglicher Hinsicht unterstützt hat.

*Potsdam, den 2.7.2012*

*Stephanie Lerm*

## 8. Literaturverzeichnis

- Aerts, J.M.F.G., Lauwers, A.M., Heinen, W. 1985. Temperature-dependent lipid content and fatty acid composition of three thermophilic bacteria. *Anton. Leeuw.* 51:155-165.
- Aertsen, A., Meersman, F., Hendrick, M.E.G., Vogel, R.F., Michiels, C.W. 2009. Biotechnology under high pressure: Applications and implications. *Trends Biotechnol.* 27:434-441.
- Akpabio, E.J., Ekott, E.J., Akpan, M.E. 2011. Inhibition and control of microbiologically influenced corrosion in oilfield materials. *Environ. Res. J.* 5(2):59-65.
- Alawi, M., Lerm, S., Vetter, A., Wolfgramm, M., Seibt, A., Würdemann, H. 2011. Diversity of sulfate-reducing bacteria in a plant using deep geothermal energy. *Grundwasser* 16(2):105-112.
- Alexander, M. 1977. Introduction to soil microbiology, 2nd edn. Wiley, New York, p. 472.
- Alfreider, A., Loferer-Krössbacher, M., Psenner, R. 1997. Influence of artificial groundwater lakes on the abundance and activity of bacteria in adjacent subsurface systems. *Water Res.* 31(4):832-840.
- Allen, L.A. 1949. The effect of nitro-compounds and some other substances on production of hydrogen-sulfide by sulphate reducing bacteria in sewage. *Proc. Soc. Appl. Bacteriol.* 2:26-38.
- Allen D.M., Ghomshei, M.M., Sadler-Brown, T.L., Dakin, A., Holtz, D. 2000. The current status of geothermal exploration and development in Canada, *Proceedings of World Geothermal Congress 2000, Kyushu-Tohoku, Japan*, pp. 55-58.
- Amann, R.I., Ludwig, W., Schleifer, K.H. 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* 59:143-169.
- Amann, R., Glöckner, F.O., Neef, A. 1997. Modern methods in subsurface microbiology: in situ identification of microorganisms with nucleic acid probes. *FEMS Microbiol. Rev.* 20(3/4):191-200.
- Amend, J.P., Teske, A. 2005. Expanding frontiers in the deep subsurface microbiology. *Palaeoecol.* 219:131-155.
- Amend, J.P., Shock, E.L. 2001. Energetics of overall metabolic reactions of thermophilic and hyperthermophilic Archaea and Bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 25:175-243.
- Amend, J.P., Teske, A. 2005. Expanding frontiers in deep subsurface microbiology. *Palaeogeogr. Palaeoclimatol. Palaeoecol.* 219:131-155.
- Amy, P.S. 1997. Microbial dormancy and survival in the subsurface. In Amy P, Haldeman D, (eds) *The microbiology of the terrestrial subsurface*. CRC Press, 185-203.
- Anandkumar, B., Choi, J.H., Venkatachari, G., Maruthamuthu, S. 2009. Molecular characterization and corrosion behavior of thermophilic (55°C) SRB *Desulfotomaculum kuznetsovii* isolated from cooling tower in petroleum refinery. *Materials and Corrosion* 60(9):730-737.

## Literaturverzeichnis

---

- Antipov, V.A., Levashova, V.I. 2002. New nitrogen-compounds as sulfate-reducing bacterial growth inhibitors in petroleum production. *Petro. Chem.* 6:475-478.
- Aragno, M. 1983. Annex 10, Impacts Microbiologiques. In Premier cycle d'exploitation de l'installation pilote SPEOS, Rapport
- Arning, E., Kölling, M., Schulz, H.D., Panteleit, B., Reichling, J. 2006. Einfluss oberflächennaher Wärmegewinnung auf geochemische Prozesse im Grundwasserleiter. *Grundwasser* 11:27-39.
- Atlas, R.M. 1981. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective. *Microbiol. Rev.* 45:180-209.
- Atomi, H. 2002. Microbial enzymes involved in carbon dioxide fixation. *J. Biosci. Bioeng.* 94:497-505.
- Avidano, L., Gamalero, E., Cossa, G.P., Carraro, E. 2005. Characterization of soil health in an Italian polluted site by using microorganisms as bioindicators. *Appl. Soil Ecol.* 30:21-33.
- Baas Becking, G.M., Moore, D. 1961. Biogenic sulfides. *Econ. Geol.* 56:259-272.
- Bachofen, R., Ferloni, P., Flynn, I. 1998. Microorganisms in the subsurface. *Microbiol. Res.* 153:1-22.
- Baker, M.A., Valett, H.M., Dahm, C.N. 2000. Organic carbon supply and metabolism in a shallow groundwater ecosystem. *Ecology* 81(11):3133-3148.
- Balkwill, D.L., Fredrickson, J.K., Thomas, J.M. 1989. Vertical and horizontal variations in the physiological diversity of the aerobic chemoheterotrophic bacterial microflora in deep southeast coastal-plain subsurface sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 55:1058-1065.
- Balkwill, D., Reeves, R., Drake, G., Reeves, J., Crocker, F., King, M., Boone, D. 1997. Phylogenetic characterization of bacteria in the subsurface microbial culture collection. *FEMS Microbiol. Rev.* 20:201-216.
- Barbic, F., Comic, L., Pljakic, E. 2000. Iron and manganese bacteria populations in groundwater sources. *Eur. Water Manage.* 3:26-30.
- Barton, L.L., Tomei, F.A. 1995. Characteristics and activity of sulfate-reducing bacteria. In *Sulfate-reducing bacteria*. Barton, L.L. (ed). Plenum Press, New York, pp. 1-32.
- Barton, L.L., Fauque, G.C. 2009. Biochemistry, physiology and biotechnology of sulfate-reducing bacteria. *Adv. Appl. Microbiol.* 68:41-98.
- Bassam, B.J., Caetano-Anolles, G., Gresshoff, P.M. 1991. Fast and sensitive staining of DNA in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* 196:80-83.
- Bastin, E.S., Greer, F.E., Merritt, C.A., Moulton, G. 1926. The presence of sulphate reducing bacteria in oil field waters. *Science* 63:21-24.
- Beatty, J.T., Overmann, J., Lince, M.T., Manske, A.K., Lang, A.S., Blankenship, R.E., Van Dover, C.K., Martinson, T.A., Plumley, F.G. 2005. An obligately photosynthetic bacterial anaerobe from a deep sea hydrothermal vent. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102:9306-9310.
- Beech, I.B., Gaylarde, C.C. 1999. Recent advances in the study of Biocorrosion - An overview. *Rev. Microbiol.* 30:177-190.



## Literaturverzeichnis

---

- Beech, I.B., Sanner, J. 2004. Biocorrosion: towards understanding interactions between biofilms and metals. *Curr. Opin. Biotechnol.* 15:181-186.
- Bekins, B.A., Godsy, E.M., Warren, E. 1999. Distribution of microbial physiologic types in an aquifer contaminated by crude oil. *Microb. Ecol.* 37:263-275.
- Belhaj, A., Desnoues, N., Elmerich, C. 2002. Alkane biodegradation in *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from polluted zone: identification of *alkB* and *alkB*-related genes. *Res. Microbiol.* 153:339-344.
- Benlloch, S., Lopez-Lopez, A., Casamayor, E.O., Ovreas, L., Goddard, V., Daae, F.L. et al., 2002. Prokaryotic genetic diversity throughout the salinity gradient of a coastal solar saltern: *Environ. Microbiol.* 4:349-360.
- Bennett, P.C., Rogers, J.R., Choi, W.J. 2001. Silicates, Silicate Weathering, and Microbial Ecology. *Geomicrobiol. J.* 18:3-19.
- Birkeland, N.K. 2005. Sulfate-reducing bacteria and archaea. In *Petroleum Microbiology*. Olivier, B., Magot, M. (eds). ASM Press, Washington, pp 35-54.
- Blank, C.E., Cady, S.L., Pace, N.R. 2002. Microbial Composition of Near-Boiling Silica-Depositing Thermal Springs throughout Yellowstone National Park. *Appl. Environ. Microbiol.* 68(10):5123-5135.
- Blöthe, M., Roden, E.E. 2009. Microbial iron redox cycle in a circumneutral-pH groundwater seep. *Appl. Environ. Microbiol.* 75(2):468-473.
- Boivin-Jahns, V., Ruimy, R., Bianchi, A., Daumas, S., Christen, R. 1996. Bacterial diversity in a deep-subsurface clay environment. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:3405-3412.
- Bonch-Osmolovskaya, E.A., Miroshnichenko, M.L., Lebedinsky, A.V., Chernyh, N.A., Nazina, T.N., Ivoilov, V.S., et al. 2003. Radioisotopic, Culture-Based, and Oligonucleotide Microchip Analyses of Thermophilic Microbial Communities in a Continental High-Temperature Petroleum Reservoir. *Appl. Environ. Microbiol.* 69(10):6143-6151.
- Bork, J., Berkhoff, S.E., Bork, S., Hahn, H.J. 2009. Using subsurface metazoan fauna to indicate groundwater–surface water interactions in the Nakdong River floodplain, South Korea. *Hydrogeol. J.* 17:61-75.
- Böttcher, J. 1992. Stoffanlieferung in das Grundwasser bei Sandböden und Stoffumsetzungen in einem Lockergesteins-Aquifer. *Habilitationsschrift, Hannover*, 118 S..
- Bothe, H., Jost, G., Schloter, M., Ward, B.B., Witzel, K. 2000. Molecular analysis of ammonia oxidation and denitrification in natural environments. *FEMS Microbiol. Rev.* 24:673-690.
- Boudreau, B.P., Arnosti, C., Jørgensen, B.B., Canfield, D.E. 2008. Comment on ‘Physical model for the decay and preservation of marine organic carbon’. *Science* 319:1615-1616.
- Briee, C., Moreira, D., Lopez-Garcia, P. 2007. Archaeal and bacterial community composition of sediment and plankton from a suboxic freshwater pond. *Res. Microbiol.* 158:213-227.

## Literaturverzeichnis

---

- Brielmann, H., Griebler, C., Schmidt, S.I., Michel, R., Lueders, T. 2009. Effects of thermal energy discharge on shallow groundwater ecosystems. *FEMS Microbiol. Ecol.* 68: 273-286.
- Brielmann, H., Lueders, T., Schreglmann, K., Ferraro, F., Avramov, M., Hammerl, V., Blum, P., Bayer, P., Griebler, C. 2011. Oberflächennahe Geothermie und ihre potenziellen Auswirkungen auf Grundwasserökosysteme. *Grundwasser* 16:77-91.
- Brondel, D., Edwards, R., Hayman, A., Hill, D., Mehta, S., Semerad, T. 1994. Corrosion in the oil industry. *Oilfield Rev.* 6: 4-18.
- Brons, H.E., Griffioen, J., Appelo, C.A.J., Zehnder, A.J.B. 1991. (Bio)geochemical reactions in aquifer material from a thermal energy storage site. *Water Res.* 25:729-736.
- Brown, D.A., Sherriff, B.L., Sawicki, J.A., Sparling, R. 1999. Precipitation of iron minerals by a natural microbial consortium. *Geoch. Cosmo. Acta* 63:2163-2169.
- Brune, A., Frenzel, P., Cypionka, H. 2000. Life at the oxic-anoxic interface: microbial activities and adaptations. *FEMS Microbiol. Rev.* 24:691-710.
- Burdige, D.J. 2007. Preservation of organic matter in marine sediments: controls, mechanisms, and an imbalance in sediment organic carbon budgets? *Chem. Rev.* 107: 467-485.
- Burke, V., Wiley, A.J. 1937. Bacteria in Coal. *J. Bacteriol.* 34:475-481.
- Buswell, A.M., Larson, T.E. 1937. Methane in groundwaters. *Journal American Water Works Association* 29:1978-1982.
- Briée, C., Moreira, D., López-García, P. 2007. Archaeal and bacterial community composition of sediment and plankton from a suboxic freshwater pond. *Res. Microbiol.* 158(3):213-227.
- Brigmon, R.L., Martin, H.W., Aldrich, H.C. 1997. Biofouling of Groundwater Systems by *Thiothrix* spp.. *Curr. Microbiol.* 35:169-174.
- Brigmon, R.L., de Ridder, C. 1998. Symbiotic relationship of *Thiothrix* spp. with echinoderms. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:3491-3495.
- Brigmon, R.L., Furlong, M., Whitman, W.B. 2003. Identification of *Thiothrix unzii* in two distinct ecosystems. *Lett. Appl. Microbiol* 36:88-91.
- Campbell, I.L., Postgate, J.R. 1965. Classification of the spore-forming sulfate-reducing bacteria. *Bacteriol Rev.* 29:359-363.
- Cardoso, R.B., Sierra-Alvarez, R., Rowlette, P., Razo Flores, E., Gómez, J., Field, J.A. 2006. Sulfide oxidation under chemolithoautotrophic denitrifying conditions. *Biotechnol. Bioeng.* 95(6):1148-1157.
- DasSarma, S., Arora, P. 2001. Halophiles. In *Encyclopedia of life Sciences*. Macmillan Press, pp.1-9.
- Cayol, J.L., Ollivier, B., Patel, B.K.C., Prensier, G., Guezennec, J., Garcia, J.L. 1994. Isolation and characterization of *Halothermothrix orenii* gen. nov., sp. nov., a halophilic, thermophilic, fermentative, strictly anaerobic bacterium. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44(3):534-540.

## Literaturverzeichnis

---

- Cayol, J.L., Fardeau, M.L., Garcia, J.L., Ollivier, B. 2002. Evidence of interspecies hydrogen transfer from glycerol in saline environments. *Extremophiles* 6:131-134.
- Celis-García, L.B., González-Blanco, G., Meraz, M. 2008. Removal of sulfur inorganic compounds by a biofilm of sulfate reducing and sulfide oxidizing bacteria in a down-flow fluidized bed reactor. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 83(3):260-268.
- Chandler, D.P., Brockman, F.J., Fredrickson, J.K. 1997. Use of 16S rRNA clone libraries to study changes in a microbial community resulting from ex situ perturbation of a subsurface sediment. *FEMS Microbiol. Rev.* 20:217-230.
- Chapelle, F.H. 2001. *Ground-water microbiology and geochemistry*. John Wiley & Sons, New York.
- Characklis, W.G. 1990. Microbial fouling. In *Biofilms*. Characklis, W.G., Marshall, K.C. (eds). Wiley, New York, pp. 523-584.
- Chivian, D., Brodie, E.L., Alm, E.J., Culley, D.E., Dehal, P.S., DeSantis, T.Z., et al. 2008. Environmental genomics reveals a single-species ecosystem deep within earth. *Science* 322:275-278.
- Coetser, S.E., Cloete, T.E. 2005. Biofouling and Biocorrosion in Industrial Water Systems. *Crit. Rev. Microbiol.* 31(4):213-232.
- Cole, J.R., Wang, Q., Cardenas, E., Fish, J., Chai, B., Farris, R.J., Kulam-Syed-Mohideen, A.S., McGarrell, D.M., Marsh, T., Garrity G.M., Tiedje, J.M. 2009. The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. *Nucl. Acids Res.* 37:D141-D145.
- Cooper, D.C., Picardal, F., Rivera, J., Talbot, C. 2000. Zinc immobilization and magnetite formation via ferric oxide reduction by *Shewanella putrefaciens* 200. *Environ. Sci. Technol.* 34:100-106.
- Costerton, J.W., Lewandowski, Z., Caldwell, D.E., Korber, D.R., Lappin-Scott, H.M. 1995. Microbial biofilms. *Annu. Rev. Microbiol.* 49:711-745.
- Cozzarelli, I.M., Baedeker, M.J., Eganhouse, R.P., Goerlitz, D.F. 1994. The geochemical evolution of low-molecular-weight organic acids derived from the degradation of petroleum contaminants in groundwater. *Geochim. Cosmochim. Acta* 58:863-877.
- Criaud, A., Fouillac, C., Marty, B., Brach, M., Wei, H.F. 1987. Gas geochemistry of the dogger geothermal aquifer. *Proceedings, Twelfth Workshop on Geothermal Reservoir Engineering Stanford University, Stanford, California, SGP-TR-109*.
- Crosby, H.A., Roden, E.E., Johnson, C.M., Beard, B.L. 2007. The mechanisms of iron isotope fractionation produced during dissimilatory Fe (III) reduction by *Shewanella putrefaciens* and *Geobacter sulfurreducens*. *Geobiol.* 5:169-189.
- Cullimore, D.R., McCann, A.E. 1978. The identification, cultivation and control of iron bacteria in ground water. In *Aquatic microbiology*. Skinner, F.A., Shewan, J.M. (eds). Academic, New York, pp 1-32.
- Cullimore, D.R. 1999. *Microbiology of well biofouling*. Lewis Publishers, Boca Raton, London, New York, Washington D.C.

## Literaturverzeichnis

---

- Cullimore, D.R. 2007. Practical Manual of Groundwater Microbiology, 2nd edn. CRC Press/Taylor & Francis Group.
- Cummings, D.E., Caccavo, F., Spring, S., Rosenzweig, R.F. 1999. *Ferribacterium limneticum*, gen. nov., sp. nov., an Fe (III)-reducing microorganism isolated from mining-impacted freshwater lake sediments. Arch. Microbiol. 171:183-188.
- Cussler, E.L. 1984. Diffusion - mass transfer in fluid systems. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom.
- Cuypers, H., Zumft, W.G. 1993. Anaerobic control of denitrification in *Pseudomonas stutzeri* escapes mutagenesis of an *fnr*-like gene. J. Bacteriol. 175:7236-7246.
- Cypionka, H., Widdel, F., Pfennig, N. 1985. Survival of sulfate reducing bacteria after oxygen stress, and growth in sulfate-free oxygen sulfide gradients. FEMS Microbiol. Ecol. 31:39-45.
- Daffonchio, D., Borin, S., Brusa, T., Brusetti, L., van der Wielen, P.W.J.J., Bolhuis, H., Yakimov, M.M., et al. 2006. Stratified prokaryote network in the oxic-anoxic transition of a deep-sea halocline. Nature 440:203-207.
- Dalas, E., Koutsoukos, P.G. 1989. Calcium carbonate scale formation on heated metal surfaces. Geothermics 18(1/2):83-88.
- Dams, E., Hendriks, L., Van de Peer, Y., Neefs, J.M., Smits, G., Vandembemt, I., De Wachter, R. 1988. Compilation of small ribosomal subunit RNA sequences. Nucleic Acids Res. 16:r87-r173.
- Dann, A.L., Cooper, R.S., Bowman, J.P. 2009. Investigation and optimization of a passively operated compost-based system for remediation of acidic, highly iron- and sulfate-rich industrial waste water. Water Res. 43(8):2302-2316.
- Daumas, S., Cord-Ruwisch, R., Garcia, J.L. 1988. *Desulfotomaculum geothermicum* sp. nov., a thermophilic, fatty acid-degrading, sulfate-reducing bacterium isolated with H<sub>2</sub> from geothermal ground water. Anton. Leeuw. 54(2):165-178.
- Davey, M.E., O'Toole, G.A. 2000. Microbial Biofilms: from Ecology to Molecular Genetics. Microbiol Mol. Biol. Rev. 64(4):847-867.
- Demadis, K.D. 2003. Combating heat exchanger fouling and corrosion phenomena in process water. In Compact Heat Exchangers and Enhancement Technology for the Process Industries. Shah, R.K. (ed). Begell House Inc, New York, pp. 483-490.
- De Mendonca, M.B., Ehrlich, M., Cammarota, M.C. 2003. Conditioning factors of iron ochre biofilm formation on geotextile filters. Can. Geotech. J. 40:1225-1234.
- Denger, K., Warthmann, R., Ludwig, W., Schink, B. 2002. *Anaerophaga thermohalophila* gen. nov., sp nov., a moderately thermohalophilic, strictly anaerobic fermentative bacterium. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 52:173-178.
- Detmers, J., Schulte, U., Strauss, H., Kuever, J. 2001. Sulfate reduction at a lignite seam: microbial abundance and activity. Microb.Ecol. 42:238-247.
- Detmers, J., Strauss, H., Schulte, U., Bergmann, A., Knittel, K., Kuever, J. 2004. FISH shows that *Desulfotomaculum* spp. are the dominating sulfate-reducing bacteria in a pristine aquifer. Microb.Ecol. 47:236-242.

## Literaturverzeichnis

---

- D'Hondt, S., Rutherford, S., Spivack, A.J. 2002. Metabolic Activity of Subsurface Life in Deep-Sea Sediments. *Science* 295:2067-2070.
- Dockins, W.S., Olson, G.J., McFeters, G.A., Turbak, S.C. 1980. Dissimilatory bacterial sulfate reduction in Montana groundwaters. *Geomicrobiol. J.* 2:83-98.
- Dohrmann, A.B., Tebbe, C.C. 2004. Microbial community analysis by PCR-single-strand conformation polymorphism (PCR-SSCP). In *Molecular microbial ecology manual*. Kowalchuk, G.A., de Bruijn, F.J., Head, I.M., Akkermans, A.D., van Elsas, J.D. (eds). 2nd ed. Kluwer, Dordrecht, pp. 809-838.
- Dolla, A., Fournier, M., Dermoun, Z. 2006. Oxygen defense in sulfate-reducing bacteria. *J. Biotechnol.* 126:87-100.
- Dong, H., Yu, B. 2007. Geomicrobiological processes in extreme environments: A review. *Episodes* 30(3):202-216.
- Douglas, S., Beveridge, T.J. 1998. Mineral formation by bacteria in natural microbial communities. *FEMS Microbiol. Ecol.* 26:79-88.
- Drysdale, G., Kasan, H., Bux, F. 1999. Denitrification by heterotrophic bacteria during activated sludge treatment. *Water SA* 25:357-362.
- Dunlap, W.J., McNabb, J.F., Scalf, M.R., Cosby, R.L. 1977. Sampling for organic chemicals and microorganisms in the subsurface. In *U.S. Environment Protection Agency Report*, pp. 77-176.
- Eckford, R.E., Fedorak, P.M. 2002. Planktonic nitrate-reducing bacteria and sulfate-reducing bacteria in some western Canadian oil field waters. *J. Ind. Microbiol. Biot.* 29:83-92.
- Ehrlich, H.L. 1998. Geomicrobiology: its significance for geology. *Earth-Sci. Rev.* 45:45-60.
- Eikelboom, D., Geurkink, B. 2002. Filamentous microorganisms observed in industrial activated sludge plants. *Water Sci. Technol.* 46:535-542.
- Emerson, D., Fleming, E.J., McBeth, J.M. 2010. Iron-oxidizing bacteria: an environmental and genomic perspective. *Annu. Rev. Microbiol.* 64:561-583.
- Engel, A.S., Lee, N., Porter, M.L., Stern, L.A., Bennett, P.C., Wagner, M. 2003. Filamentous "Epsilonproteobacteria" Dominate Microbial Mats from Sulfidic Cave Springs. *Appl. Environ. Microbiol.* 69(9):5503-5511.
- Engel, A.S., Meisinger, D.B., Porter, M.L., Payn, R.A., Schmid, M., Stern, L.A., Schleifer, K.H., Lee, N.M. 2010. Linking phylogenetic and functional diversity to nutrient spiraling in microbial mats from Lower Kane Cave (USA). *ISME J.* 4:98-110.
- Farquhar, G.J., Boyle, W.C. 1972. Control of *Thiothrix* in activated sludge. *J. Water Poll. Control. Fed.* 44:14-24.
- Feldrappe, H., Obst, K., Wolfgramm, M. Evaluation of sandstone aquifers of the North German Basin: a contribution to the „Geothermal Information System of Germany. *Proceedings European Geothermal Congress 2007*. pp 8
- Feller, G., Gerday, C. 2003. Psychrophilic enzymes: Hot topics in cold adaptation. *Nat. Rev. Microbiol.* 1:200-208.

## Literaturverzeichnis

---

- Finster, K., Liesack, W., Thamdrup, B. 1998. Elemental sulfur and thiosulfate disproportionation by *Desulfocapsa sulfoexigens* sp. nov., a new anaerobic bacterium isolated from marine surface sediment. *Appl. Environ. Microbiol.* 64(1):119-125.
- Flemming, H.C. 1994. Biofilme, Biofouling und mikrobielle Schädigung von Werkstoffen. Kommissionsverlag R. Oldenbourg, Stuttgart.-München.
- Flemming, H.C. 1996. Economical and technical overview. In *Microbially influenced corrosion of materials*. Heitz, E., Flemming, H.C., Sand, W. (eds). Springer-Verlag, New York, pp. 6-14.
- Flemming, H.C. 2002. Biofouling in water systems – cases, causes and countermeasures. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 59:629-640.
- Flemming, H.C., Neu, T.R. Wozniak, D.J. 2007. The EPS Matrix: The “House of Biofilm Cells”. *J. Bacteriol.* 189(22):7945-7947.
- Flemming, H.C. 2008. Biofilms. In *Encyclopedia of life sciences*. John Wiley, Chichester.
- Ford, H.W., Tucker, D.P.H. 1975. Blockage of drip irrigation filters and emitters by iron-sulfur-bacterial products. *Hort. Science* 10:62-64.
- Fossing, H., Gallardo, V.A., Jørgensen, B.B., Hüttel, M., Nielsen, L.P., Schultz, H., Canfield, D.E., et al. 1995. Concentration and transport of nitrate by the mat-forming sulphur bacterium *Thioploca*. *Nature* 374:713-715.
- Fredrickson, J.K., Garland, T.R., Hicks, R.J., Thomas, J.M., Li, S.W., McFadden, K.M. 1989. Lithotrophic and heterotrophic bacteria in deep subsurface sediments and their relation to sediment properties. *Geomicrobiol. J.* 7:53-66.
- Fredrickson, J.K., McKinley, J.P., Nierzwicki-Bauer, S.A., White, D.C., Ringelberg, D.B., Rawson, S.A., Li, S.M., et al. 1995. Microbial community structure and biogeochemistry of Miocene subsurface sediments: implications for long-term microbial survival. *Mol. Ecol.* 4:619-626.
- Fredrickson, J.K., Zachara, J.M., Kennedy, D.W., Dong, H., Onstott, T.C., Hinman, N.W., Li S.M. 1998. Biogenic iron mineralization accompanying the dissimilatory reduction of hydrous ferric oxide by a groundwater bacterium. *Geochim. Cosmochim. Acta* 62:3239-3257.
- Fredrickson, J.K., Balkwill, D.L. 2006. Geomicrobial processes and biodiversity in the deep terrestrial subsurface, *Geomicrobiol. J.* 23:345-356.
- Freitag, T.E., Prosser, J.I. 2003. Community structure of ammonia-oxidizing bacteria within anoxic marine sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:1359-1371.
- Friedrich, C.G., Bardischewsky, F., Rother, D., Quentmeier, A., Fischer, J. 2005. Prokaryotic sulfur oxidation. *Curr. Opin. Microbiol.* 8:253-259.
- Frontier, S. 1985. Diversity and structure in aquatic ecosystems. *Oceanogr. Mar. Biol.* 23:253-312.
- Fry, J.C., Parkes, R.J., Cragg, B.A., Weightman, A.J., Webster, G. 2008. Prokaryotic biodiversity and activity in the deep subseafloor biosphere. *FEMS Microbiol. Ecol.* 66:181-196.



## Literaturverzeichnis

---

- Fujino, Y., Kawatsu, R., Inagaki, F., Umeda, A., Yokoyama, T., Okaue, Y., Iwai, S., Ogata, S., Ohshima, T., Doi, K. 2008. *Thermus thermophilus* TMY isolated from silica scale taken from a geothermal power plant. *J. Appl. Microbiol.* 104:70-78.
- Gadd, G.M. 2000. Bioremedial potential of microbial mechanisms of metal mobilization and immobilization. *Curr. Opin. Biotechnol.* 11:271-279.
- Gadd, G.M. 2010. Metals, minerals and microbes: geomicrobiology and bioremediation. *Microbiol.* 156:609-643.
- Gallup, D.L. 2002. Investigations of organic inhibitors for silica scale control in geothermal brines. *Geothermics* 31:415-430.
- Gallup, D.L. 2009. Production engineering in geothermal technology: A review. *Geothermics* 38:326-334.
- Gaylarde, C.C., Beech, I.B. 1988. Molecular basis of bacterial adhesion to metal, In *Microbial corrosion*. Sequeira, C.A.C., Tiller, A.K. (eds). Elsevier Applied Science, London and New York, pp. 20-28.
- Geets, J., Borremans, B., Diels, L., Springael, D., Vangronsveld, J., van der Lelie, D., Vanbroekhoven, K. 2006. DsrB gene-based DGGE for community and diversity surveys of sulfate-reducing bacteria. *J. Microbiol. Methods* 66:194-205.
- Georlette, D., Blaise, V., Collins, T., D'Amico, S., Gratia, E., Hoyoux, A., Marx, J.C., et al. 2004. Some like it cold: biocatalysis at low temperatures. *FEMS Microbiol. Rev.* 28:25-42.
- Gevertz, D., Telang, A.J., Voordouw, G., Jenneman, G.E. 2000. Isolation and Characterization of Strains CVO and FWKO B, Two Novel Nitrate-Reducing, Sulfide-Oxidizing Bacteria Isolated from Oil Field Brine. *Appl. Environ. Microbiol.* 66(6):2491-2501.
- Ghiorse, W.C., Wilson, J.T. 1988. *Microbial Ecology of the Terrestrial Subsurface*. *Adv. Appl. Microbiol.* 33:107-172.
- Ghosh, W., Dam, B. 2009. Biochemistry and molecular biology of lithotrophic sulfuroxidation by taxonomically and ecologically diverse bacteria and archaea. 2009. *FEMS Microbiol. Rev.* 33:999-1043.
- Gianese, G., Bossa, F., Pascarella, S. 2002. Comparative structural analysis of psychrophilic and meso- and thermophilic enzymes. *Proteins* 47:236-249.
- Gibert, J.: Basic attributes of groundwater ecosystems and prospects for research. 1994. In *Groundwater Ecology*. Gibert, J., Stanford, J.A., Danielopol, D.L. (eds). Academic Press, San Diego, CA., pp.571
- Gieg, L.M., Jack, T.R., Foght, J.M. 2011. Biological souring and mitigation in oil reservoirs. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 92:263-282.
- Giovannoni, S.J., Britschgi, T.B., Moyer, C.L., Field, K.G. 1990. Genetic diversity in Sargossa Sea bacterioplankton. *Nature* 345:60-63.
- Goldscheider, N., Hunkeler, D., Rossi, P. 2006. Review: Microbial biocenoses in pristine aquifers and an assessment of investigative methods. *Hydrogeol. J.* 0:1-16.

## Literaturverzeichnis

---

- Griebler, C., Lueders, T. 2009. Microbial biodiversity in groundwater ecosystems. *Freshwater Biology* 54:649-677.
- Griebler, C., Mindl, B., Slezak, D., Geiger-Kaiser, M. 2002. Distribution patterns of attached and suspended bacteria in pristine and contaminated shallow aquifers studied with an *in situ* sediment exposure microcosm. *Aquat. Microbiol. Ecol.* 28:117-129.
- Griffioen, J., Appelo, C.A.J. 1993. Nature and extent of carbonate precipitation during aquifer thermal energy storage. *Appl. Geochem.* 8:161-176.
- Grigoryan, A., Voordouw, G. 2008. Microbiology to help solve our energy needs: methanogenesis from oil and the impact of nitrate on the oil-field sulfur cycle. *Ann. NY Acad. Sci.* 1125:345-352.
- Haaiker, S.C.M., Harhangi, H.R., Meijerink, B.B., Strous, M., Pol, A., Smolders, A.J.P., Verwegen, K., et al. 2008. Bacteria associated with iron seeps in a sulfur-rich, neutral pH, freshwater ecosystem. *ISME J.* 2:1231-1242.
- Hall-Stoodley, L., William Costerton, J., Stoodley, P. 2004. Bacterial biofilms from the natural environment to infectious diseases. *Nat. Rev. Microbiol.* 2:95-198.
- Hamamura, N., Olson, S.H., Ward, D.M., Inskeep, W.P. 2006. Microbial Population Dynamics Associated with Crude-Oil Biodegradation in Diverse Soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 72(9):6316-6324.
- Hamilton, W.A. 1983. Sulphate-reducing bacteria and the offshore oil industry. *Trends Biotechnol.* 1(2):36-40.
- Hamilton, W.A. 1985. Sulphate-reducing bacteria and anaerobic corrosion. *Ann. Rev. Microbiol.* 39:195-217.
- Hamilton, W.A. 2003. Microbiologically influenced corrosion as a model system for the study of metal microbe interactions: A unifying electron transfer hypothesis. *Biofouling* 19:65-76.
- Harshey, R.M. 2003. Bacterial motility on surface: many ways to a common goal. *Annu. Rev. Microbiol.* 57:249-273.
- Hartman, W.H., Richardson, C.J., Vilgalys, R., Bruland, G.L. 2008. Environmental and anthropogenic controls over bacterial communities in wetland soils. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105 (46):17842-17847.
- Harvey, R.W., Smith, R.L., George, L. 1984. Effects of organic contamination upon microbial distributions and heterotrophic uptake in a Cape Cod, Mass., Aquifer. *Appl. Environ. Microbiol.* 48(6):1197-1202.
- Hasselbarth, U, Lüdemann, D. 1967a. Die biologische Verockerung von Brunnen durch Massenentwicklung von Eisen- und Manganbakterien. *Bohrtechnik Brunnenbau Rohrleitungsbau* 18:363-368.
- Hasselbarth, U, Lüdemann, D. 1967b. Die biologische Verockerung von Brunnen durch Massenentwicklung von Eisen- und Manganbakterien (II). *Bohrtechnik Brunnenbau Rohrleitungsbau* 18:401-406.
- Hasselbarth, U, Lüdemann, D. 1972. Biological encrustation of wells due to mass development of iron and manganese bacteria. *Water Treatm. Exam.* 21:20-29.



## Literaturverzeichnis

---

- Head, I.M., Jones, D.M., Larter, S.M. 2003. Biological activity in the deep subsurface and the origin of heavy oil. *Nature* 426:344-352.
- Hedges, J.I., Keil, R.G. 1995. Sedimentary organic matter preservation: an assessment and speculative synthesis. *Marine Chemistry* 49:81-115.
- Hedrich, S., Schlömann, M., Johnson, D.B. 2011. The iron-oxidizing proteobacteria. *Microbiol* 157:1551-1564.
- Henderson, P. 2010. Fouling and anti-fouling in other industries: power stations, desalination plants, drinking water supplies and sensors. In *Biofouling*. Dürr, S., Thomas, J.C. (eds). Wiley-Blackwell, Chichester, pp. 288-305
- Hoffmann, F., Wolfgramm, M., Möllmann, G. 2008. Geothermische Heizzentrale Neuruppin mit balneologischer Anwendung. *Geothermische Energie* 59:24-28.
- Holmer, M., Storkholm, P. 2001. Sulphate reduction and sulphur cycling in lake sediments: a review. *Freshwater Biology* 46(4):431-451.
- Holmes, B., Owen, R.J., McMeekin, T.A. Genus *Flavobacterium*. 1984. *Bergey's manual of systematic bacteriology* Bergey, Harrison, Breed, Hammer and Huntoon, 1923, 97, p. 353-361. In N. R. Krieg (ed), vol. 1. The Williams & Wilkins Co., Baltimore.
- Honegger, J.L., Czernichowski-Lauriol, I., Criaud, A., Menjoz, A., Sainson, S., Guezennec, J. 1989. Detailed study of sulfide scaling at la courneuve nord, a geothermal exploitation of the Paris Basin, France. *Geothermics* 18(1-2):137-144.
- Hori, T., Noll, M., Igarashi, Y., Friedrich, M.W., Conrad, R. 2007. Identification of Acetate-Assimilating Microorganisms under Methanogenic Conditions in Anoxic Rice Field Soil by Comparative Stable Isotope Probing of RNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 73(1):101-109.
- Houben, G.J., Weihe, U. 2010. Spatial distribution of incrustations around a water well after 38 years of use. *Groundwater* 48(1):53-58.
- Howsam, P. 1988. Biofouling in wells and aquifers. *J. Inst. Water Environ. Manag.* 2:209-215.
- Hubert, C., Voordouw, G. 2007. Oil field souring control by nitrate-reducing *Sulfurospirillum* spp. that outcompete sulfate-reducing bacteria for organic electron donors. *Appl. Environ. Microbiol.* 73:2644-2652.
- Hubert, C., Arnosti, C., Brüchert, V., Loy, A., Vandieken, V., Jørgensen, B.B. 2010. Thermophilic anaerobes in Arctic marine sediments induced to mineralize complex organic matter at high temperature. *Environ. Microbiol.* 12(4):1089-1104.
- Hugenholtz, P., Goebel, B.M., Pace, N.R. 1998. Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *J. Bacteriol.* 180(18):4765-4774.
- Imhoff, J.F., Hiraishi, A., Suling, J. 2005. Anoxygenic phototrophic purple bacteria. In Brenner, D.J., Krieg, N.R., Staley, J.T. (eds) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* 2nd ed. Vol 2 Part A. Springer, New York., pp. 119-132
- Inagaki, F., Hayashi, S., Doi, K., Motomura, Y., Izawa, E., Ogata, S. 1997. Microbial participation in the formation of siliceous deposits from geothermal water and analysis

- of the extremely thermophilic bacterial community. *FEMS Microbiol. Ecol.* 24(1):41-48.
- Inagaki, F., Takai, K., Hirayama, H., Yamato, Y., Nealson, K.H., Horikoshi, K. 2003. Distribution and phylogenetic diversity of the subsurface microbial community in a Japanese epithermal gold mine. *Extremophiles* 7:307-317.
- Inagaki, F., Okada, H., Tsapin, A.I., Nealson, K.H. 2005. The paleome: a sedimentary genetic record of past microbial communities. *Astrobiol.* 5:141-153.
- Inskeep, W. P., Bloom P. R. 1986. Kinetics of calcite precipitation in the presence of water-soluble organic ligands. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 50:1167-1172.
- Ivanova, I.A., Stephen, J.R., Chang, Y.J., Brüggemann, J., Long, P.E., McKinley, J.P., Kowalchuk, G.A., et al. 2000. A survey of 16S rRNA and *amoA* genes related to autotrophic ammonia-oxidizing bacteria of the b-subdivision of the class proteobacteria in contaminated groundwater. *Can. J. Microbiol.* 46(11):1012-1020.
- Jain, R.K., Kapur, M., Labana, S., Lal, B., Sarma, P.M., Bhattacharya, D., Shekhar Thakur, I. 2005. Microbial diversity: Application of microorganisms for the biodegradation of xenobiotics. *Curr. Sci.* 89(1):101-112.
- Jakobsen, R., Postma, D. 1999. Redox zoning, rates of sulfate reduction and interactions with Fe-reduction and methanogenesis in a shallow sandy aquifer, Rømø, Denmark. *Geochim Cosmochim Acta* 63(1):137-151.
- Jakobsen, T.F., Kjeldsen, K.U., Ingvorsen, K. 2006. *Desulfohalobium utahense* sp. nov., a moderately halophilic, sulfate-reducing bacterium isolated from Great Salt Lake. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56:2063-2069.
- Janssen, P.H., Schuhmann, A., Bak, F., Liesack, W. 1996. Disproportionation of inorganic sulfur compounds by the sulfate-reducing bacterium *Desulfocapsa thiozymogenes* gen. nov., sp. nov. *Arch. Microbiol.* 166:184-192.
- Javaherdashti, R. 2011. Impact of sulphate-reducing bacteria on the performance of engineering materials. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 91:1507-1517.
- Jesußek, A., Grandel, S., Dahmke, A. 2012. Impacts of subsurface heat storage on aquifer hydrogeochemistry. *Environ Earth Sci.* DOI 10.1007/s12665-012-2037-9.
- Jørgensen, B.B. 1982. Mineralization of organic matter in the sea bed - the role of sulphate reduction. *Nature* 296:643-645.
- Johnson, S.S., Hebsgaard, M.B., Christensen, T.R., Mastepanov, M., Nielsen, R., Munch, K., Brand, T., et al. 2007. Ancient bacteria show evident of DNA repair. *PNAS* 104:14401-14405.
- Johnston, T.C., Cano, D.V., Sutanto, Y. 2007. Seasonal Dynamics of the Bacterial Community of a Mudflat at the Mouth of a Major Kentucky Lake Reservoir Tributary. *J. Ky. Acad. Sci.* 68(1):81-88.
- Kabus, F., Seibt, P. 2000. Aquifer thermal energy storage for the Berliner Reichstag building – new seat of the German Parliament. *Proceedings of the World Geothermal Congress*, 3611-3615.

## Literaturverzeichnis

---

- Kabus, F., Bartels, J. 2004. Speicherung von Wärme und Kälte in Grundwasserleitern. *Energietechnik/Kälteversorgung* 5:170-175.
- Kabus, F., Wolfgramm, M. 2009. Aquifer thermal energy storage in Neubrandenburg – Monitoring throughout three years of regular operation. In *Proceedings of the 11th International Conference on Energy Storage 2009*, Stockholm, Sweden, 8 pp.
- Kalanetra, K.M., Huston, S.L., Nelson, D.C. 2004. Novel, Attached, Sulfur-Oxidizing Bacteria at Shallow Hydrothermal Vents Possess Vacuoles Not Involved in Respiratory Nitrate Accumulation. *Appl. Environ. Microbiol.* 70(12):7487-7496.
- Kalbitz, K., Solinger, S., Park, J.H., Michalzik, B., Matzner, E. 2000. Controls on the dynamics of dissolved organic matter in soils: A review. *Soil Sci.* 165:277-304.
- Kallmeyer, J., Smith, D.C., Spivack, A.J., D'Hondt, S. 2008. New cell extraction procedure applied to deep subsurface sediments. *Limnol. Oceanogr: Methods* 6:236-24.
- Kalmbach, S., Manz, W., Wecke, J., Szewzyk, U. 1999. *Aquabacterium* gen. nov., with description of *Aquabacterium citratiphilum* sp. nov., *Aquabacterium parvum* sp. nov. and *Aquabacterium commune* sp. nov., three in situ dominant bacterial species from the Berlin drinking water system. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49:769-777.
- Kampschreur, M.J., Tan, N.C.G., Picioreanu, C., Jetten, M.S.M. Schmidt, I., van Loosdrecht, M.C.M. 2006. Role of nitrogen oxides in the metabolism of ammonia-oxidizing bacteria. *Biochemical Soc. Trans.* 34:179-181.
- Kanagawa, T., Kamagata, Y., Aruga, S., Kohno, T., Horn, M. Wagner, M. 2000. Phylogenetic analysis of and oligonucleotide probe development for Eikelboom type 021N filamentous bacteria isolated from bulking activated sludge. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:5043-5052.
- Karr, E.A., Sattley, W.M., Rice, M.R., Jung, D.O., Madigan, M.T., Achenbach, L.A. 2005. Diversity and distribution of sulfate reducing bacteria in permanently frozen Lake Fryxell. *Appl. Environ. Microbiol.* 71(10):6353-6359.
- Kashefi, K., Lovley, D.R. 2003. Extending the upper temperature limit for life. *Science* 301:934.
- Kaye, J.Z., Baross, J.A. 2004. Synchronous Effects of Temperature, Hydrostatic Pressure, and Salinity on Growth, Phospholipid Profiles, and Protein Patterns of Four *Halomonas* Species Isolated from Deep-Sea Hydrothermal-Vent and Sea Surface. *Appl. Environ. Microbiol.* 70(10):6220-6229.
- Kempf, B., Bremer, E. 1998. Uptake and synthesis of compatible solutes as microbial stress compounds to high-osmolality environments. *Arch. Microbiol.* 170:319-330.
- Kim, I.S., Lee, G.H., Lee, K.J. 2000. Monitoring and Characterization of Bacterial Contamination in a High-Purity Water System Used for Semiconductor Manufacturing. *J. Microbiol.* 38(2):99-104.
- Kirchman, D.L. 2002. The ecology of *Cytophaga-Flavobacteria* in aquatic environments. *FEMS Microbiol. Ecol.* 39:91-100.

## Literaturverzeichnis

---

- Kjeldsen, K.U., Loy, A., Jakobsen, T.F., Thomsen, T.R., Wagner, M., Ingvorsen, K. 2007. Diversity of sulfate-reducing bacteria from an extreme hypersaline sediment, Great Salt Lake (Utah). *FEMS Microbiol Ecol* 60(2):287-298.
- Kleikemper, J. 2003. Activity and Diversity of Sulfate-Reducing and Methanogenic Microorganisms in a Petroleum-Contaminated Aquifer. Doktorarbeit. ETH Zürich. Naturwissenschaften
- Klotzbücher, T., Kappler, A., Straub, K.L., Haderlein, S.B. 2007. Biodegradability and groundwater pollutant potential of organic anti-freeze liquids used in borehole heat exchangers. *Geothermics* 36:348-361.
- Kodama, Y., Watanabe, K. 2003. Isolation and characterization of a sulfur-oxidizing chemolithotroph growing on crude oil under anaerobic conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 69 (1):107-112.
- Kodama, Y., Watanabe, K. 2004. *Sulfuricurvum kujiense* gen. nov., sp. nov., a facultatively anaerobic, chemolithoautotrophic, sulfur-oxidizing bacterium isolated from an underground crude-oil storage cavity. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54:2297-2300.
- Kodama, Y., Thu Ha, L., Watanabe, K. 2007. *Sulfurospirillum cavolei* sp. nov., a facultatively anaerobic sulfur-reducing bacterium isolated from an underground crude oil storage cavity. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57:827-831.
- Köhler, M., Bochnig, S., Völsger, F., Hofmann, K. 1997. Mikrobiologie der Thermalwässer. GFZ-Report STR 97/15:95-100.
- Köhler, M., Bochnig, S., Völsger, F., Hofmann, K. 1997a. Untersuchungsmethoden zur geochemischen Charakterisierung der Thermalwässer. GFZ-Report STR 97/15:100-108.
- Kojima, H., Koizumi, Y., Fukui, M. 2006. Community structure of bacteria associated with sheaths of freshwater and brackish *Thioploca* Species. *Microb. Ecol.* 52:765-773.
- Konstantinidis, K.T., Isaacs, N., Fett, J., Simpson, S., Long, D.T., Marsh, T.L. 2003. Microbial Diversity and Resistance to Copper in Metal-Contaminated Lake Sediment. *Microb. Ecol.* 45:191-202.
- Kondratieva, E.N., Pfennig, N., Truper, H.G. 1999. The Phototrophic Prokaryotes. In *The Prokaryotes*. Springer Verlag, New York.
- Kovacik, W.P.Jr., Takai, K., Mormile, M.R., McKinley, J.P., Brockman, F.J., Fredrickson, J.K., Holben, W.E. 2006. Molecular analysis of deep subsurface Cretaceous rock indicates abundant Fe (III)- and S<sup>0</sup>-reducing bacteria in a sulfate-rich environment. *Environ. Microbiol.* 8:141-155.
- Krumholz, L.R., McKinley, J.P., Ulrich, G.A., Suflita, J.M. 1997. Confined subsurface microbial communities in Cretaceous rock. *Nature* 386:64-66.
- Kühn, M., Niewöhner, C., Isenbeck-Schröter, M., Schulz, H.D. 1998. Determination of major and minor constituents in anoxic thermal brines of deep sandstone aquifers in northern Germany. *Wat. Res.* 32(2):265-274.
- Kumar, S., Nussinov, R. 2001. How do thermophilic proteins deal with heat. *CMLS Cell. Mol. Life Sci.* 58:1216-1233.

## Literaturverzeichnis

---

- Kushner, D.J. 1978. Life in high salt and solute concentrations: halophilic bacteria, in microbial life in extreme environments. Kushner, D.J. (ed). Academic Press, London, pp. 317-368.
- Lane, D.J., Pace, B., Olsen, G.J., Stahl, D.A., Sogin, M.L., Pace, N.R. 1985. Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. Proc. Natl. Acad. Sci. 82:6955-6959.
- Lane, D.J. 1991. 16S/23S rRNA sequencing. In: Stackebrandt E, Goodfellow M (eds) Nucleic acid techniques in bacterial systematics. Wiley, Chichester, United Kingdom, pp 115-175.
- Larkin, J.M., Shinabarger, D.L. 1983. Characterization of *Thiothrix nivea*. Int. J. Syst. Bacteriol. 33:841-846.
- Larsen, H. 1986. Halophilic and halotolerant microorganisms-an overview and historical perspective. FEMS Microbiol. Rev. 39:3-7.
- Larsen, J. 2002. Downhole nitrate applications to control sulfate reducing bacteria activity and reservoir souring. Corrosion 2002 Paper 02025:1-10.
- Lau, M.C.Y., Aitchison, J.C., Pointing, S.B. 2009. Bacterial community composition in thermophilic microbial mats from five hot springs in central Tibet. Extremophil 13:139-149.
- Leahy, J.G., Colwell, R.R. 1990. Microbial Degradation of Hydrocarbons in the Environment. Microbiol. Rev. 54(3):305-315.
- LeChevallier, M.W., Besner, M.C., Friedman, M., Speight, V.L. 2011. Microbiological quality control in distribution systems. In water quality and treatment. Edzwald, J.K. (ed). McGraw-Hill Professional, pp. 94.
- Lee, W., Lewandowski, Z., Nielsen, P.H., Hamilton, W.A. 1995. Role of sulfate-reducing bacteria in corrosion of mild steel: a review. Biofouling 8:165-194.
- Lerm, S., Alawi, M., Miethling-Graff, R., Wolfgramm, M., Rauppach, K., Seibt, A., and Würdemann, H. 2011a. Influence of microbial processes on the operation of a cold store in a shallow aquifer: impact on well injectivity and filter lifetime. Grundwasser 16(2):93-104.
- Lerm, S., Alawi, M., Miethling-Graff, R., Wolfgramm, M., Rauppach, K., Seibt, A., and Würdemann, H. 2011b. Mikrobiologisches Monitoring in zwei geothermisch genutzten Aquiferen des Norddeutschen Beckens. Z. geol. Wiss. 39(3-4):195-212.
- Li, H, Yu, Y, Luo, W, Zeng, Y, Chen, B. 2009. Bacterial diversity in surface sediments from the Pacific Arctic Ocean. Extremophil 13:233-246.
- Lien, T, Madsen, M, Gjerdevik, K. 1998. *Desulfobulbus rhabdiformis* sp. nov., a sulfate reducer from a water-oil separation system. Int. J. Syst. Bacteriol. 48:469-474.
- Lin, L.H., Wang, P.L., Rumble, D., Lippmann-Pipke, J., Boice, E., Pratt, L.M. et al. Long-term sustainability of a high-energy, low-diversity crustal biome. 2006. Science 314:479-482.
- Little, B., Wagner, P., Mansfeld, F. 1991. Microbiologically influenced corrosion of metals and alloys. Intern. Mat. Rev. 36:253-272.

## Literaturverzeichnis

---

- Little, B.L., Wagner, P.A., Hart, K.R., Ray, R.I. 1996. Spatial relationships between bacteria and localized corrosion. Corrosion/96, paper no. 278 (Houston, TX: NACE International).
- Little, B.J., Lee, J.S. 2007. Microbiologically Influenced Corrosion. Wiley Series in Corrosion. Winston, R. (ed). John Wiley & Sons, New Jersey.
- López-Archilla, A.I., Moreira, D., Velasco, S., López-García, P. 2007. Archaeal and bacterial community composition of a pristine coastal aquifer in Doñana National Park, Spain. *Aquat. Microb. Ecol.* 47:123-139.
- López-García, P., Duperron, S., Philippot, P., Foriel, J., Susini, J., Moreira, D. 2003. Bacterial diversity in hydrothermal sediment and epsilonproteobacterial dominance in experimental microcolonizers at Mid-Atlantic Ridge. *Environ. Microbiol.* 5:961-976.
- Lovley, D.R., Phillips, E.J.P. 1986. Organic-Matter Mineralization with Reduction of Ferric Iron in Anaerobic Sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 51:683-689.
- Lovley, D.R., Phillips, E.J.P. 1988. Novel Mode of Microbial Energy-Metabolism - Organic-Carbon Oxidation Coupled to Dissimilatory Reduction of Iron or Manganese. *Appl. Environ. Microbiol.* 54:1472-1480.
- Lovley, D.R., Chapelle, F.H. 1995. Deep subsurface microbial processes. *Rev. Geophys.* 33(3):365-381.
- Lovley, D.R., Coates, J.D., Blunt-Harris, E.L., Phillips, E.J.P., Woodward, J.C. 1996. Humic substances as electron acceptors for microbial respiration. *Nature* 382:445-448.
- Lovley, D.R., Fraga, J.L., Blunt-Harris, E.L., Hayes, L.A., Phillips, E.J.P., Coates, J.D. 1998. Humic substances as a mediator for microbially catalyzed metal reduction. *Acta Hydrochim. Hydrobiol.* 26:152-157.
- Ludwig, W., Strunk, O., Westram, R., Richter, L., Meier, H., Yadhukumar, et al. 2004. ARB: a software environment for sequence data. *Nucleic Acids Res.* 32:1363-1371.
- Macalady, J.L., Lyon, E.H., Koffman, B., Albertson, L.K., Meyer, K., Galdenzi, S., Mariani, S. 2006. Dominant Microbial Populations in Limestone-Corroding Stream Biofilms, Frasassi Cave System, Italy. *Appl. Environ. Microbiol.* 72(8):5596-5609.
- Macalady, J.L., Dattagupta, S., Schaperdoth, I., Jones, D.S., Druschel, G.K., Eastman, D. 2008. Niche differentiation among sulfur-oxidizing bacterial populations in cave waters. *ISME* 2:590-601.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., Parker, J. 2003. Brock biology of microorganisms, 10th ed. Prentice Hall, Pearson Education, Upper Saddle River, N.J.
- Magot, M., Ollivier, B., Patel, B.K.C. 2000. Microbiology of petroleum reservoirs. *Anton. Leeuw.* 77:103-116.
- Martin-Laurent, F., Philippot, L., Hallet, S., Chaussod, R., Germon, J.C., Soulas, G., Catroux, G. 2001. DNA Extraction from Soils: Old Bias for New Microbial Diversity Analysis Methods. *Appl. Environ. Microbiol.* 67(5):2354-2359.
- McGlannan, M.F., Makemson, J.C. 1990. HCO<sub>3</sub>-fixation by naturally occurring tufts and pure cultures of *Thiothrix nivea*. *Appl. Environ. Microbiol.* 3:730-738.



## Literaturverzeichnis

---

- McMahon, P.B., Chapelle, F.H. 1991. Microbial production of organic acids in aquitard sediments and its role in aquifer geochemistry. *Nature* 349:233-235.
- McHatton, S.C., Barry, J.P., Jannasch, H.W., Nelson, D.C. 1996. High nitrate concentrations in vacuolate, autotrophic marine *Beggiatoa* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:954-958.
- Meyer-Reil, L.A. 1994. Microbial life in sedimentary biofilms – the challenge to microbial ecologists. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 112:303-311.
- Miller, D.N., Smith, R.L. 2009. Microbial characterization of nitrification in a shallow, nitrogen-contaminated aquifer, Cape Cod, Massachusetts and detection of a novel cluster associated with nitrifying Betaproteobacteria. *J. Contam. Hydrol.* 103(3-4):182-193.
- Ming, D.W. 2002. Carbonates. In: *Encyclopedia of soil science*, ed R Lal, Marcel Dekker Inc. New York pp 139-142.
- Miranda-Herrera, C., Saucedo, I., González-Sánchez, J., Acuña, N. 2010. Corrosion degradation of pipeline carbon steels subjected to geothermal plant conditions. *Anti-Corrosion Methods and Materials* 57(4):167-172.
- Möller, P., Weise, S.M., Tesmer, M., Dulski, P., Pekdeger, A., Bayer, U., Magri, F. 2008. Salinization of groundwater in the North German Basin: results from conjoint investigation of major, trace element and multi-isotope distribution. *Int. J. Earth Sci. (Geol Rundsch)* 97:1057-1073.
- Morofsky, E.L. 1994. ATEs energy efficiency, economics and the environment. *Proceedings international symposium aquifer thermal energy storage*. University of Alabama, Tuscaloosa, Alabama USA.
- Morozova, D., Wandrey, M., Alawi, M., Zimmer, M., Vieth, A., Zettlitzer, M., Würdemann, H. 2010. Monitoring of the microbial community composition in saline aquifers during CO<sub>2</sub> storage by fluorescence in situ hybridisation. *Int. J. Greenhouse Gas Control* 4(6):981-989.
- Morris, R.M., Rappé, M.S., Urbach, E., Connon, S.A., Giovannoni, S.J. 2004. Prevalence of the *Chloroflexi*-related SAR202 bacterioplankton cluster throughout the mesopelagic zone and deep ocean. *Appl. Environ. Microbiol.* 70(5):2836-2842.
- Morse, J.W., Millero, F.J., Cornwell, J.C., Rickard, D. 1987. The chemistry of the hydrogen sulfide and iron sulfide systems in natural waters. *Earth-Sci. Rev.* 24:1-42.
- Mueller-Spitz, S.R., Goetz, G.W., McLellan, S.L. 2009. Temporal and spatial variability in nearshore bacterioplankton communities of Lake Michigan. *FEMS Microbiol. Ecol.* 67(3):511-522.
- Murphy, E., Schramke, J., Fredrickson, J., Bledsoe, H., Francis, A., Sklarew, D., Linehan, J. 1992. The influence of microbial activity and sedimentary organic carbon on the isotope geochemistry of the Middendorf aquifer. *Water Resour. Res.* 28:723-740.
- Muyzer, G, de Waal, EC, Uitterlinden, AG. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Envir. Microbiol.* 59:695-700.

## Literaturverzeichnis

---

- Muyzer, G., Hottentrager, S., Teske, A., Wawer, C. 1996. Denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified 16S rDNA. A new molecular approach to analyze the genetic diversity of mixed microbial communities. In *Molecular microbial ecology manual*. Akkermans, A.D.L., van Elsas, J.D., de Bruijn, F.J. (eds). Kluwer Academic Publishing, Dordrecht. pp. 1-23.
- Muyzer, G., Smalla, K. 1998. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Anton. Leeuw. Int. J. Gen. Mol. Microbiol.* 73:127-141.
- Muyzer, G., Stams, A.J.M. 2008. The ecology and biotechnology of sulphate-reducing bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* 6:441-454.
- Nakagawa, S., Takai, K., Inagaki, F., Hirayama, H., Nunoura, T., Horikoshi, K., Sako, Y. 2005. Distribution, phylogenetic diversity and physiological characteristics of epsilon-Proteobacteria in a deep-sea hydrothermal field. *Environ. Microbiol.* 7(10):1619-1632.
- Nakasone, K., Ikegami, A., Kato, C., Usami, R., Horikoshi, K. 1998. Mechanisms of gene expression controlled by pressure in deep-sea microorganisms. *Extremophiles* 2:149-154.
- Näveke, R., Matthess, G., Pekdeger, A., Graff, M., Schenk, D., Kaufmann-Knoke, R., Morche, A., Lutz, T. 1992. Charakterisierung von Biofilmen und ihrer hydrochemischen Milieus im Hinblick auf fördertechnische Probleme in der Erdölförderung. DGMK Abschlussbericht (BMFT Fördernummer 0319218A)
- Nealson, K.H., Saffarini, D. 1994. Iron and manganese in anaerobic respiration - environmental significance, physiology, and regulation. *Ann. Rev. Microbiol.* 48:311-343.
- Nealson, K.H., Inagaki, F., Takai, K. 2005. Hydrogen-driven subsurface lithoautotrophic microbial ecosystems (SLiMEs): do they exist and why should we care? *Trends Microbiol.* 13(9):405-410.
- Neria-Gonzalez, I., Wang, E.T., Ramirez, F., Romero, J.M., Hernandez-Rodriguez, C. 2006. Characterization of bacterial community associated to biofilms of corroded oil pipelines from the southeast of Mexico. *Anaerobe* 12:122-133.
- Newton, R.J., Kent, A.D., Triplett, E.W., McMahon, K.D. 2006. Microbial community dynamics in a humic lake: differential persistence of common freshwater phylotypes. *Environ. Microbiol.* 8(6):956-970.
- Nichols, D., Miller, M.R., Davies, N.W., Goodchild, A., Raftery, M., Cavicchioli, R. 2004. Cold adaptation in the Antarctic archaeon, *Methanococoides burtonii*, involves membrane lipid unsaturation. *J. Bacteriol.* 186:8508-8515.
- Nielsen, P.H., Jahn, A., Palmgren, R. 1997. Conceptual model for production and composition of exopolymers in biofilms. *Water Sci. Technol.* 36:11-19.
- Nielsen, P.H., de Muro, M.A., Nielsen, J.L. 2000. Studies on the in situ physiology of *Thiothrix* spp. present in activated sludge. *Environ. Microbiol.* 2 (4):389-398.



## Literaturverzeichnis

---

- Nielsen, N.M., Winding, A., Binnerup, S., Hansen, B.M., Kroer, N. 2002. Microorganisms as Indicators of Soil Health. National Environmental Research Institute (NERI). Technical Report No. 388.
- Obst, K., Wolfgramm, M. 2010. Geothermische, balneologische und speichergeologische Potenziale und Nutzungen des tieferen Untergrundes der Region Neubrandenburg. Neubrandenburger Geol. Beitr. 10:145-174.
- Ohta, H., Hattori, R., Ushiba, Y., Mitsui, H., Ito, M., Watanabe, H., Tonosaki, A., Hattori, T. 2004. *Sphingomonas oligophenolica* sp. nov., a halo- and organo-sensitive oligotrophic bacterium from paddy soil that degrades phenolic acids at low concentrations. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 54:2185-2190.
- Opel, O., Eggerichs, T., Linares, J.A.N., Ruck, W.K.L. 2008. Zusammenhänge zwischen gemessenen und aus  $\text{Fe}^{2+}$ -Konzentrationen errechneten Redoxpotentialen in den Fluiden der thermischen Aquifer-Energiespeicher im Energiesystem der Parlamentsbauten am Spreebogen in Berlin. Vom Wasser 106(4):3-38.
- Oren, A. 2001. The bioenergetic basis for the decrease in metabolic diversity at increasing salt concentrations: implications for the functioning of salt lake ecosystems: Hydrobiologia 466:61-72.
- Orphan, V.J., Taylor, L.T., Hafenbradl, D., Delong, E.F. 2000. Culture-dependent and culture-independent characterization of microbial assemblages associated with high-temperature petroleum reservoirs. Appl. Environ. Microbiol. 66:700-711.
- Overmann, J., Garcia-Pichel, F. 2000. The Phototrophic Way of Life. In The Prokaryotes: An Evolving Electronic Resource for the Microbiological Community. Dworkin, M. et al. (eds), 3rd edition (latest update release 3.11, September 2002), Springer, New York.
- Paksoy, H.O., Andersson, O., Abaci, H., Evliya, H., Turgut, B. 2000. Heating and cooling of a hospital using solar energy coupled with seasonal thermal energy storage in aquifer. Renew. Energy 19:177-122.
- Pankhania, I.P. 1988. Hydrogen metabolism in sulphate-reducing bacteria and its role in anaerobic corrosion. Biofouling 1:27-47.
- Park, J., Sanford, R.A., Bethke, C.M. 2006. Geochemical and microbiological zonation of the Middendorf aquifer, South Carolina. Chem. Geol. 230:88-104.
- Parkes, R.J., Cragg, B.A., Bale, S.J., Getliff, J.M., Goodman, K., Rochelle, P.A., et al. 1994. Deep bacterial biosphere in pacific ocean sediments. Nature 371:410-413.
- Parkes, R.J., Cragg, B.A., Wellsbury, P. 2000. Recent studies on bacterial populations and processes in subseafloor sediments: a review. Hydrogeol. J. 8:11-28.
- Parkes, R.J., Sass, H. 2007. The sub-seafloor biosphere and sulphate-reducing prokaryotes: their presence and significance. In Sulphate-reducing bacteria: environmental and engineered systems. Barton, L, and Hamilton, W.A. (eds). Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom, pp. 329-358.
- Patureau, D., Zumstein, E., Delgenes, J.P., Moletta, R. 2000. Aerobic denitrifiers isolated from diverse natural and managed ecosystems. Microb. Ecol. 39:145-152.
- Pedersen, K. 1993. The deep subterranean biosphere. Earth-Sci. Rev. 34:243-260.

## Literaturverzeichnis

---

- Pedersen, K. 2000. Exploration of deep intraterrestrial microbial life: current perspectives. FEMS Microbiol. Lett. 185:9-16.
- Pedersen, K., 2001. Diversity and activity of microorganisms in deep igneous rock aquifers of the fennoscandian shield. In Subsurface microgeobiology and biogeochemistry. Frederick, J.F., Fletcher, M. (eds). Wiley-Liss, New York, pp. 97-139.
- Peduzzi, S., Tonolla, M., Hahn, D. 2003. Isolation and characterization of aggregate-forming sulfate-reducing and purple sulfur bacteria from the chemocline of meromictic Lake Cadagno, Switzerland. FEMS Microbiol. Ecol. 45(1):29-37.
- Philpotts, A.R. 1990. Principles of Igneous and Metamorphic Petrology. Englewood Cliffs, New Jersey: Prentice Hall. pp 498.
- Pernthaler, J., Glöckner, F.O., Schönhuber, W., Amann, R. 2001. Fluorescence in situ hybridization (FISH) with rRNA-targeted oligonucleotide probes. Methods Microbiol. 30:207-226.
- Phelps, T.J., Fliermans, C.B., Garland, T.R., Pfiffner, S.M., White, D.C. 1989. Methods for recovery of deep terrestrial subsurface sediments for microbiological studies. J. Microbiol. Methods 9(4):267-279.
- Porter, M.L., Engel, A.S. 2008. Diversity of uncultured Epsilonproteobacteria from terrestrial sulfidic caves and springs. Appl. Environ. Microbiol. 74(15):4973-4977.
- Postgate, J.R. 1984. The sulfate-reducing bacteria, 2nd ed, Cambridge University Press, London
- Pot, B., Gillis, M. 1992. The genus *Aquaspirillum*. In The Prokaryotes, Ballows, A., Trüper, H.G.M., Dworkin, Hander, W., Schleifer, K.H. (eds), 2nd edn Vol. 3. Springer-Verlag, New York, NY., pp. 2569-2582.
- Price, P.B., Sowers, T. 2004. Temperature dependence of metabolic rates for microbial growth, maintenance, and survival. PNAS 101(13):4631-4636.
- Pronk, M., Goldscheider, N., Zopfi, J. 2009. Microbial communities in karst groundwater and their potential use for biomonitoring. Hydrogeol. J. 17:37-48.
- Pryfogle, P.A. 2005. Monitoring biological activity at geothermal power plants. Idaho National Laboratory.
- Rabus, R., Hansen, T., Widdel, F. 2000. Dissimilatory sulfate and sulfur-reducing prokaryotes. In The Prokaryotes: an Evolving electronic resource for the microbial community. Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.H., Stackebrandt, E. (eds), Springer-Verlag, New York.
- Rabus, R., Hansen, T., Widdel, F. 2006. Dissimilatory sulfate- and sulfur-reducing prokaryotes. In The Prokaryotes. Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H., Stackebrandt, E. (eds). Vol. 2. Springer, New York, pp. 659-768.
- Ralph, D.E., Stevenson, J.M. 1995. The role of bacteria in well clogging. Water Res. 29:365-369.
- Reardon, E.J. 1995. Anaerobic Corrosion of Granular Iron: Measurement and Interpretation of Hydrogen Evolution Rates. Environ. Sci. Technol. 29:2936-2945.

## Literaturverzeichnis

---

- Reed, M.H., Palandri, J. 2006. Sulfide Mineral Precipitation from Hydrothermal Fluids. *Rev. Mineral. Geochem.* 61:609-631.
- Reed, D.W., Smith, J.M., Francis, C.A., Fujita, Y. 2010. Response of ammonia-oxidizing bacterial and archaeal populations to organic nitrogen amendments in low-nutrient groundwater. *Appl. Environ. Microbiol.* 76(8):2517-2523.
- Reysenbach, A.L., Longnecker, K., Kirshtein, J. 2000. Novel bacterial and archaeal lineages from an in situ growth chamber deployed at a Mid-Atlantic Ridge hydrothermal vent. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:3798-3806.
- Ridgway, H.F., Means, E.G., Olson, B.H. 1981. Iron bacteria in drinking water distribution system: elemental analysis of *Gallionella* stalks, using X-ray energy dispersive microanalysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 41:288-297.
- Roberts, M.F. 2005. Organic compatible salutes of halotolerant and halophilic microorganisms. *Sal. Syst.* 1:5-30.
- Roden, E.E., Wetzel, R.G. 2003. Competition between Fe(III)-Reducing and Methanogenic Bacteria for Acetate in Iron-Rich Freshwater Sediments. *Microb. Ecol.* 45:252-258.
- Roden, E.E., Sobolev, D., Glazer, B., Luther, G.W. 2004. Potential for microscale bacterial Fe redox cycling at the aerobic-anaerobic interface. *Geomicrobiol. J.* 21:379-391.
- Roden, E.E. 2006. Geochemical and microbiological controls on dissimilatory iron reduction. *Comptes Rendus Geoscience* 338:456-467.
- Röling, W.F.M., Milner, M.G., Jones, D.M., Fratepietro, F., Swannell, R.P.J., Daniel, F., Head, I.M. 2004. Bacterial community dynamics and hydrocarbon degradation during a field-scale evaluation of bioremediation on a mudflat beach contaminated with buried oil. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:2603-2613.
- Rogers, J.R., Bennett, P.C., Choi, W.J. 1998. Feldspars as a source of nutrients for microorganisms. *J. Am. Miner.* 83:1532-1540.
- Rossetti, S., Blackall, L.L., Levantesi, C., Uccelletti, D., Tandoi, V. 2003. Phylogenetic and physiological characterization of a heterotrophic, chemolithoautotrophic *Thiothrix* strain isolated from activated sludge. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53:1271-1276.
- Rothman, D.H., Forney, D.C. 2007. Physical model for the decay and preservation of marine organic carbon. *Science* 316:1325-1328.
- Russell, R.J.M. 2000. Toward a molecular understanding of cold activity of enzymes from psychrophiles. *Extremophil* 4:83-90.
- Samain, E., Dubourguier, H.C., Albagnac, G. 1984. Isolation and characterization of *Desulfobulbus elongatus* sp. nov. from a mesophilic industrial digester. *Syst. Appl. Microbiol.* 5:391-401.
- Sand, W. 1996. Microbial mechanism. In *Microbial influenced corrosion of materials*. Heintz, E., Fleming, H.C., Sand, W. (eds). Springer-Verlag, Berlin und Heidelberg, pp. 16-25.
- Sand, W. 2003. Microbial life in geothermal waters. *Geothermics* 32:655-667.
- Sanner, B. 2001. Shallow geothermal energy. *GHC Bull.* 22:19-25.

## Literaturverzeichnis

---

- Sanner, B., Kabus, F., Seibt, P., Bartels, J. 2005. Underground thermal energy storage for the German Parliament in Berlin. System concept and operational experiences. Proceedings World Geothermal Congress Antalya, paper 1438, pp. 1-8.
- Sarbu, S.M., Kane, T.C., Kinkle, B.K. 1996. A chemoautotrophically based cave ecosystem. *Science* 272:1953-1955.
- Sass, A., Rütters, H., Cypionka, H., Sass, H. 2002. *Desulfobulbus mediterraneus* sp. nov., a sulfate-reducing bacterium growing on mono- and disaccharides. *Arch. Microbiol.* 177:468-474
- Sass, H., Cypionka, H. 2004. Isolation of Sulfate-Reducing Bacteria from the Terrestrial Deep Subsurface and Description of *Desulfovibrio cavernae* sp. nov. *System. Appl. Microbiol.* 27:541-548.
- Satoh, K., Itoh, C., Kang, D.-J., Sumida, H., Takahashi, R., Isobe, K., Sasaki, S., Tokuyama, T. 2007. Characteristics of newly isolated ammonia-oxidizing bacteria from acid sulfate soil and the rhizoplane of *Leucaena* grown in that soil. *Soil Sci. Plant Nutr.* 53:23-31.
- Satoh, H., Odagiri, M., Ito, T., Okabe, S. 2009. Microbial community structures and in situ sulfate-reducing and sulfur-oxidizing activities in biofilms developed on mortar specimens in a corroded sewer system. *Water Res.* 43(18):4729-4739.
- Sattley, W.M., Madigan, M.T. 2006. Isolation, Characterization, and Ecology of Cold-Active, Chemolithotrophic, Sulfur-Oxidizing Bacteria from Perennially Ice-Covered Lake Fryxell, Antarctica. *Appl. Environ. Microbiol.* 72(8):5562-5568.
- Scheffer, F., Schachtschnabel, P. 2002. *Lehrbuch der Bodenkunde*, Spektrum Akademischer Verlag.
- Schmidt, T., Mangold, D., Müller-Steinhagen, H. 2003. Seasonal thermal energy storage in Germany. Proceedings of the International Solar Energy Society (ISES) Solar World Congress 2003, Göteborg, Sweden, pp. 1-7.
- Schmidt, T., Mangold, D., Müller-Steinhagen, H. 2004. Central solar heating plants with seasonal storage in Germany. *Solar Energy* 76:165-174.
- Schulz, H. N., Brinkhoff, T., Ferdelman, T.G., Hernández Mariné, M., Teske, A., Jørgensen, B.B. 1999. Dense populations of a giant sulfur bacterium in Namibian shelf sediments. *Science* 284:493-495.
- Schwieger, F., Tebbe, C.C. 1998. A new approach to utilize PCR–Single-Strand-Conformation Polymorphism for 16S rRNA gene-based microbial community analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:4870-4876.
- Seibt, P., Kabus, F. 2006. Aquifer thermal energy storage – Projects implemented in Germany. Proceedings of Ecostock, New Jersey, pp. 8.
- Seibt, A., Thorwart, K. 2011. Untersuchungen zur Gasphase geothermisch genutzter Tiefenwässer und deren Relevanz für den Anlagenbetrieb. *Z. geol. Wiss.* 39(3-4):261-274.

## Literaturverzeichnis

---

- Sette, L.D., Simioni, K.C., Vasconcellos, S.P., Dussan, L.J., Neto, E.V., Oliveira, V.M. 2007. Analysis of the composition of bacterial communities in oil reservoirs from a southern offshore Brazilian basin. *Anton. Leeuw.* 91(3):253-266.
- Shi, T., Fredrickson, J.K., Balkwill, D.L. 2001. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Sphingomonas* strains isolated from the terrestrial subsurface. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 26:283-289.
- Shock, E.L. 2009. Minerals as Energy Sources for Microorganisms. *Econ. Geol.* 104:1235-1248.
- Sievert, S.M., Kuever, J., Muyzer, G. 2000. Identification of 16S ribosomal DNA-defined bacterial populations at a shallow submarine hydrothermal vent near Milos Island (Greece). *Appl. Environ. Microbiol.* 66(7):3102-3109.
- Skinner, B.J., White, D.E., Rose, H.J., Mays, R.E. 1967. Sulfides associated with the Salton Sea geothermal brine. *Econ. Geol.* 62:316-330.
- Slobodkin, A.I., Jeanthon, C., L'Haridon, S., Nazina, T., Miroshnichenko, M., Bonch-Osmolovskaya, E. 1999. Dissimilatory reduction of Fe(III) by thermophilic bacteria and archaea in deep subsurface petroleum reservoirs of Western Siberia. *Curr. Microbiol.* 39:99-102.
- Smalå, A.O., Leiros, H.K., Os, V., Willassen, N.P. 2000. Cold adapted enzymes. *Biotechnol. Annu. Rev.* 6:1-57.
- Smith, J.E. 2002. Committee report on controll of microorganisms in drinking water. In *Control of microorganisms in microorganisms, illustrated edn.* Lingireddy, S. (ed). American Society of Civil Engineers, USA, pp. 1-8.
- Spalding, R.F., Gormly, J.R., Nash, K.G. 1978. Carbon contents and sources in ground waters of the central Platte region in Nebraska. *J. Environ. Qual.* 7:428-434.
- Stapleton, R.D., Bright, N.G., Sayler, G.S. 2000. Catabolic and genetic diversity of degradative bacteria from fuel-hydrocarbon contaminated aquifers. *Microb. Ecol.* 39:211-221.
- Steube, C., Richter, S., Griebler, C. 2009. First attempts towards an integrative concept for the ecological assessment of groundwater ecosystems. *Hydrogeol. J.* 17:23-35.
- Stevens, T.O. 1997. Lithoautotrophy in the subsurface. *FEMS Microbiol. Rev.* 20:327-337.
- Stott, M.B., Crowe, M.A., Mountain, B.W., Smirnova, A.V., Hou, S., Alam, M., Dunfield, P.F. 2008. Isolation of novel bacteria, including a candidate division, from geothermal soils in New Zealand. *Environ. Microbiol.* 10(8):2030-2041.
- Straub, K.L., Benz, M., Schink, B. Widdel, F. 1996. Anaerobic, nitrate-dependent microbial oxidation of ferrous iron. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:1458-1460.
- Straub, K.L., Benz, M., Schink, B. 2001. Iron metabolism in anoxic environments at near neutral pH. *FEMS Microbiol. Ecol.* 34:181-186.
- Straub, K.L., Schönhuber, W.A., Buchholz-Cleven, B.E.E., Schink, B. 2004. Diversity of ferrous iron-oxidizing, nitrate reducing bacteria and their involvement in oxygen independent iron cycling. *Geomicrobiol. J.* 21:371-378.

## Literaturverzeichnis

---

- Struchtemeyer, C.G., Davis, J.P., Elshahed, M.S. 2011. Influence of the drilling formulation mud process on the microbial communities in thermogenic natural gas wells of the Barnett shale. *Appl. Environ. Microbiol.* 77(14):4744-4753.
- Stumm, W., Morgan, J.J. 1981. *Aquatic Chemistry*, 2nd edition. Wiley-Interscience, New York.
- Stumm, W., Sulzberger, B. 1992. The cycling of iron in natural environments: Considerations based on laboratory studies of heterogeneous redox processes. *Geochim. Cosmochim. Acta* 56:3233-3257.
- Sunde, E., Torsvik, T. 2005. Microbial control of hydrogen sulfide production in oil reservoirs. In *Petroleum microbiology*. Ollivier, B., Magot, M. (ed), ASM Press, Washington, D.C., pp. 201-213.
- Suzina, N.E., Mulyukin, A.L., Kozlova, A.N., Shorokova, A.P., Dmitriev, V.V., Barinova, E.S., Mokhova, O.N., El'-Registan, G.I., Duda, V.I. 2004. Ultrastructure of resting cells of some non-spore-forming bacteria. *Microbiology* 73:516-529.
- Suzuki, M.T., Giovannoni, S.J. 1996. Bias Caused by Template Annealing in the Amplification of Mixtures of 16S rRNA Genes by PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 62(2):625-630.
- Suzuki, D., Ueki, A., Amaishi, A., Ueki, K. 2007. *Desulfobulbus japonicus* sp. nov., a novel Gram-negative propionate-oxidizing, sulfate-reducing bacterium isolated from an estuarine sediment in Japan. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57:849-855.
- Takai, K., Horikoshi, K. 1999. Genetic Diversity of archaea in deep-sea hydrothermal vent environments. *Genetics* 152:1285-1297.
- Takai, K., Mormile, M.R., McKinley, J.P., Brockman, F.J., Holben, W.E., Kovacik, W.P., Fredrickson, J.K. 2003. Shifts in archaeal communities associated with lithological and geochemical variations in subsurface Cretaceous rock. *Environ. Microbiol.* 5:309-320.
- Takai, K., Suzuki, M., Nakagawa, S., Miyazaki, M., Suzuki, Y., Inagaki, F., Horikoshi, K. 2006. *Sulfurimonas paravinellae* sp. nov., a novel mesophilic, hydrogen- and sulfur-oxidizing chemolithoautotroph within the Epsilonproteobacteria isolated from a deep-sea hydrothermal vent polychaete nest, reclassification of *Thiomicrospira denitrificans* as *Sulfurimonas denitrificans* comb. nov. and emended description of the genus *Sulfurimonas*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56:1725-1733.
- Takai, K., Nakamura, K., Toki, T., Tsunogai, U., Miyazaki, M., Miyazaki, J., Hirayama, H., et al. 2008. Cell proliferation at 122°C and isotopically heavy CH<sub>4</sub> production by a hyperthermophilic methanogen under high-pressure cultivation. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 105:10949-10954.
- Taylor, S.W., Lange, C.R., Lesold, E.A. 1997. Biofouling of Contaminated Ground-Water Recovery Wells: Characterization of Microorganisms. *Groundwater* 35(2):973-980.
- Teixeira de Mattos, M.J., Neijssel, O.M. 1997. Bioenergetic consequences of microbial adaptation to low-nutrient environments. *J. Biotechnol.* 59:117-126.



## Literaturverzeichnis

---

- Teske, A., Stahl, D.A. 2002. Microbial Mats and Biofilms: Evolution, structure, and function of fixed microbial communities. In *Biodiversity of Microbial Life*. Staley, J.T., Reysenbach, A.-L. (eds), Wiley-Liss, New York, 49-100.
- Teske, A., Hinrichs, K.U., Edgcomb, V., de Vera Gomez, A., Kysela, D., Sylva, S.P., Sogin, M.L., Jannasch, H.W. 2002. Microbial Diversity of Hydrothermal Sediments in the Guaymas Basin: Evidence for Anaerobic Methanotrophic Communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 68(4):1994-2007.
- Tiller, A.K. 1988. The Impact of microbial induced corrosion on engineering alloys. In *Microbial corrosion*. Sequeira, C.A.C., Tiller, A.K. (ed). Elsevier Applied Science, London and New York, pp. 3-9.
- Torsvik, V., Ovreas, L. 2002. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Curr. Opin. Microbiol.* 5:240-245.
- Trudinger, P.A. Swaine, D.J. (eds) 1979. *Biogeochemical Cycling of Mineral-Forming Elements*. Elsevier, Amsterdam, 612 pp.
- Tuovinen, O.H., Nurmiaho, E. 1979. Microscopic examination of bacteria in Fe (III)-oxide deposited from groundwater. *Microbial Ecol.* 5:57-66.
- Valdez, B., Schorr, M., Quintero, M., Carrillo, M., Zlatev, R., Stoytcheva, M., de Dios Ocampo, J. 2009. Corrosion and scaling at Cerro Prieto geothermal field. *Anti-Corrosion Methods and Materials* 56(1):28-34.
- Vance, I., Thrasher, D.R. 2005. Reservoir souring: mechanisms and prevention, In *Petroleum microbiology*. Ollivier, B., Magot, M. (eds). ASM Press, Washington, D.C., pp. 123-142.
- Van Beek, C.G.E.M., van der Kooij, D. 1982. Sulphate-reducing bacteria in ground water from clogging and nonclogging shallow wells in the Netherlands river region. *Ground water* 20(3):298-302.
- Van Beek, C.G.E.M. 1989. Rehabilitation of clogged discharge wells in the Netherlands. *Quarterly Journal of Engineering Geology*, London 22:75-80.
- Van Hamme, J.D., Singh, A., Ward, O.P. 2003. Recent Advances in Petroleum Microbiology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 67(4):503-549.
- Vetter, A., Vieth-Hillebrand, A., Schettler, G., Seibt, A., Wolfgramm, M., Mangelsdorf, K. 2011. Biogeochemical monitoring of a shallow geothermally used aquifer system in the North German Basin. *Z. geol. Wiss.* 39 3-4:241-260.
- Vetter, A., Mangelsdorf, K., Wolfgramm, M., Rauppach, K., Schettler, G., Vieth-Hillebrand, A. 2012. Variations in the fluid chemistry and membrane phospholipid fatty acid composition of the bacterial community in a cold storage groundwater system during iron clogging events. *Appl. Geochem.* 27:1278-1290.
- Vetter, A., Mangelsdorf, K., Schettler, G., Seibt, A., Wolfgramm, M., Rauppach, K., Vieth-Hillebrand, A. 2012. Fluid chemistry and impact of different operating modes on microbial community at Neubrandenburg heat storage (Northeast German Basin). *Organ. Geochem.* 53:8-15.

## Literaturverzeichnis

---

- Videla, H.A., Herrera, L.K. 2005. Microbiologically influenced corrosion: looking to the future. *Int. Microbiol.* 8:169-180.
- Vieth, A., Mangelsdorf, K., Sykes, R., Horsfield, B. 2008. Water extraction of coals – potential for estimating low molecular weight organic acids as carbon feedstock for the deep terrestrial biosphere. *Organ. Geochem.* 39(8):985-991.
- Von Wolzogen Kuehr, C.A.H., van der Vlugt, I.S. 1934. The graphitization of cast iron as an electrochemical process in anaerobic soil. *Water* 18:147-165.
- Wagner, R., Koch, M., Adinolfi, M. 1988. Chemische und biologische Prozesse in Aquiferwärmespeichern. *Stuttgarter Berichte zur Siedlungswasserwirtschaft Bd. 101*, Kommissionsverlag R. Oldenbourg, München.
- Wagner, M., Roger, A.J., Flax, J.L., Brusseau, G.A., Stahl, D.A. 1998. Phylogeny of dissimilatory sulfite reductases supports an early origin of sulfate respiration. *J. Bacteriol.* 180:2975-2982.
- Watanabe, K., Kodama, Y., Harayama, S. 2001 Design and evaluation of PCR primers to amplify bacterial 16S ribosomal DNA fragments used for community fingerprinting. *J. Microbiol. Methods* 44:253-262.
- Weber, K.A., Achenbach, L.A., Coates, J.D. 2006. Microorganisms pumping iron: anaerobic microbial iron oxidation and reduction. *Nature Rev. Microbiol.* 4:752-764.
- Wellsbury, P., Mather, I., Parkes, R.J. 2002. Geomicrobiology of Deep, Low Organic Carbon Sediments in the Woodlark Basin, Pacific Ocean. *FEMS Microbiol. Ecol.* 42:59-70.
- Whitman, W.B., Coleman, D.C., Wiebe, W.J. 1998. Prokaryotes: the unseen majority. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:6578-6583.
- Widdel, F., Pfennig, N. 1982. Studies on dissimilatory sulfate-reducing bacteria that decompose fatty acids. II. Incomplete oxidation of propionate by *Desulfobulbus propionicus* gen. nov., sp. nov. *Arch. Microbiol.* 131:360-365.
- Williams, M.M., Domingo, J.W.S., Meckes, M.C., Kelty, C.A., Rochon, H.S. 2004. Phylogenetic diversity of drinking water bacteria in a distribution system simulator. *J. Appl. Microbiol.* 96:954-964.
- Wilms, R., Köpke, B., Sass, H., Chang, T.S., Cypionka, H., Engelen, B. 2005. Deep biosphere-related bacteria within the subsurface of tidal flat sediments. *Environ. Microbiol.* 8(4):709-719.
- Wilms, R., Sass, H., Köpke, B., Cypionka, H., Engelen, B. 2007. Methane and sulfate profiles within the subsurface of a tidal flat are reflected by the distribution of sulfate reducing bacteria and methanogenic archaea. *FEMS Microbiol. Ecol.* 59(3):611-621.
- Wilson, J.T., McNabb, J.F., Balkwill, D.L., Ghiorse, W.C. 2006. Enumeration and characterization of bacteria indigenous to a shallow water-table aquifer. *Groundwater* 21(2):134-142.
- Wingender, J., Neu, T., Flemming, H.C. 1999. What are bacterial extracellular polymer substances? In *Bacterial extracellular polymer substances*. Wingender, J., Neu, T., Flemming, H.C. (eds). Springer, Berlin Heidelberg New York, pp 1-19.
- Woese, C.R. 1987. Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* 51(2):221-271.



## Literaturverzeichnis

---

- Wolfgramm, M., Seibt, A. 2006. Geochemisches Monitoring des geothermalen Tiefenspeichers in Neubrandenburg, GTV-Tagung, Karlsruhe, Germany, pp. 388-397.
- Wolfgramm, M., Lenz, G., Rauppach, K. 2007. Stimulations- und Testarbeiten an den Bohrungen Gt Nn S 1/06 und Gt Nn S 2/07 vom 04.01.2007-24.04.2007.- GTN-Bericht 3529: 1-51, 4 Anlagen, unpubliziert.
- Wolfgramm, M., Rauppach, K., Puronpää-Schäfer, P. 2010. Berliner Parlamentsbauten – Betrieb, Monitoring und Regenerierungen N<sub>2</sub>-beaufschlagter Kältespeicherbrunnen. *Energie Wasser-Praxis* 61 (10):38-45.
- Wolfgramm, M., Rauppach, K., Thorwarth, K. 2011. Mineralneubildung und Partikeltransport im Thermalwasserkreislauf geothermischer Anlagen Deutschland. *Z. geol. Wiss.* 39 3-4: 213-239.
- Wolfaardt, G.M., Lawrence, J.R., Korber, D.R. (eds) 1999. Role of EPS in nutrition. In *Microbial extracellular polymeric substances*. Springer Verlag, Germany, pp. 177-178
- Wolfe, R.L., Ward, N.R., Olson, B.H. 1985. Inactivation of heterotrophic bacterial populations in finished drinking water by chlorine and chloramines. *Water Res.* 9(2):1393-1403.
- Wu, X., Yang, H. 2009. Molecular Characterization of Sulfate-Reducing Bacteria in Leachate-polluted Aquifers in Laogang - A Landfill Along the Shore of the East China Sea. *Can. J. Microbiol.* 55(7):818-828.
- Würdemann, H., Alawi, M., Lerm, S., Miethling-Graff, R., Vetter, A., Vieth-Hillebrand, A., Wandrey, M. 2010. Betriebssicherheit der geothermischen Nutzung von Aquiferen unter besonderer Berücksichtigung mikrobiologischer Aktivität und Partikelumlagerungen - Screening an repräsentativen Standorten. Abschlussbericht (BMU, Kennzeichen 0327634)
- Yu, Y., Lee, C., Kim, J., Hwang, S. 2005. Group-specific primer and probe sets to detect methanogenic communities using quantitative real-time polymerase chain reaction. *Biotechnol. Bioeng.* 89:670-679.
- Zachara, J.M., Kukkadapu, R.K., Fredrickson, J.K., Gorby, Y.A., Smith, S.C. 2002. Biomineralization of poorly crystalline Fe (III) oxides by dissimilatory metal reducing bacteria (DMRB). *Geomicrobiol. J.* 19:179-207.
- Zarda, B., Hahn, D., Chatzinotas, A., Schönhuber, W., Neef, A., Amann, R., Zeyer, J. 1997. Analysis of bacterial community structure in bulk soil by in situ hybridisation. *Arch. Microbiol.* 168:185-192.
- ZoBell, C.E. 1947. Microbial transformation of molecular hydrogen in marine sediments, with particular reference to petroleum. *Bull. Am. Assn. Petrol. Geol.* 31:1709-1751.
- Zhu, X.Y., Lubeck, J., Kilbane, II J.J. 2003. Characterization of microbial communities in gas industry pipelines. *Appl. Environ. Microbiol.* 69(9):5354-5363.