

Bakterielle Diversität in einer Wasserbehandlungsanlage zur Reinigung saurer Grubenwässer

E. Heinzel¹, S. Hedrich¹, G. Rätzel², M. Wolf², E. Janneck², J. Seifert¹, F. Glombitza², M. Schlömann¹

¹AG Umweltmikrobiologie, IÖZ, TU Bergakademie Freiberg, Leipziger Str. 29, 09599 Freiberg, elke.heinzel@ioez.tu-freiberg.de,

²Fa. G.E.O.S. Ingenieurgesellschaft mbH, Gewerbepark „Schwarze Kiefern“, 09633 Halsbrücke

In einer Versuchsanlage zur Gewinnung von Eisenhydroxysulfaten durch biologische Oxidation von zweiwertigem Eisen wurde die Zusammensetzung der bakteriellen Lebensgemeinschaft mit molekulargenetischen Methoden analysiert. Die 16S rDNA-Klonbank wurde von zwei Sequenztypen, denen 68 % der Klone zugeordnet werden konnten, dominiert. Ein Sequenztyp kann phylogenetisch in die Ordnung der *Nitrosomonadales* eingeordnet werden, zu deren Vertretern sowohl chemo-heterotrophe Bakterien als auch autotrophe Eisen und Ammonium oxidierende Bakterien gehören. Der zweite Sequenztyp ist ähnlich zu „*Ferrimicrobium acidiphilum*“, einem heterotrophen Eisenoxidierer.

The microbial community of a pilot plant for the production of iron hydroxysulfates by biological oxidation of ferrous iron was studied using molecular techniques. The 16S rDNA clone library was dominated by two sequence types, to which 68 % of all clones could be assigned. One sequence type is phylogenetically classified to the order of *Nitrosomonadales*. Both chemoheterotrophic bacteria and autotrophic iron or ammonium oxidizing bacteria belong to this order. The second sequence type is related to “*Ferrimicrobium acidiphilum*”, a heterotrophic iron oxidizing bacteria.

1 Einleitung und Projektziel

Stark eisenhaltige und saure Bergbauwässer aus Tagebaufolgelandschaften bedingen einen erheblichen Sanierungsaufwand. Die konventionelle Reinigung dieser Wässer findet durch pH-Wertanhebung und Fällung mit Kalk ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) statt. Bei dieser Behandlungsmethode werden erhebliche Kalkmengen benötigt, was einen intensiven Kostenfaktor darstellt. Weiterhin fallen bei diesem Verfahren große Mengen schlecht entwässerbarer Eisenhydroxidschlämme an, für die es keine industrielle Verwendung gibt.

Eine alternative Möglichkeit zu dieser Wasserbehandlungsmethode stellt die Einbeziehung einer vorgeschalteten biologischen Oxidationsstufe dar. Dabei werden im sauren pH-Bereich Eisenhydroxysulfate ausgefällt, was zu einer Verringerung der Eisenfracht in die chemische Behandlungsstufe führt. Diese Eisenhydroxysulfate besitzen für eine Abtrennung und Weiterverarbeitung weitaus günstigere chemische Eigenschaften als die Eisenhydroxide und können zum Beispiel als Grundstoff für Farbpigmente genutzt werden.

Um in der biologischen Oxidationsstufe möglichst kurze Verweilzeiten und damit hohe Durchflussraten zu erreichen, ist es notwendig,

die biologische Oxidationskapazität zu optimieren. Zur Gewährleistung einer konstanten Produktqualität muss die Oxidation sicher beherrscht und gesteuert werden können. Dies erfordert die Analyse der mikrobiellen Lebensgemeinschaft.

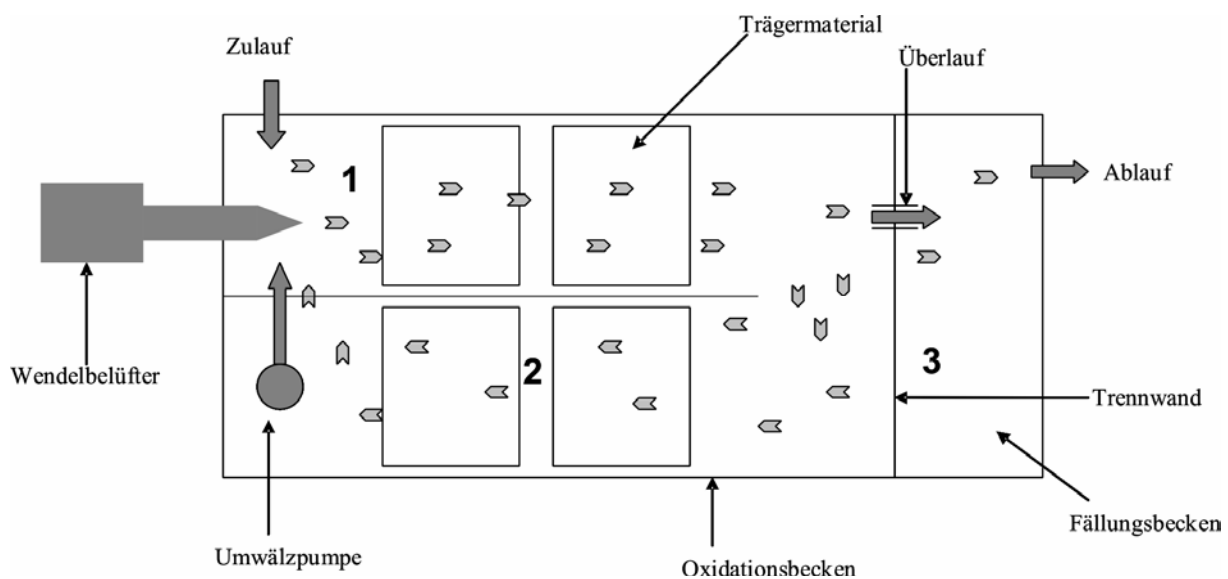
2 Standort der Versuchsanlage

Auf der Kippe im Tagebau Nochten wird von der Fa. G.E.O.S. eine Versuchsanlage für die biologische Oxidation des zweiwertigen Eisens betrieben. Dabei soll der Einfluss verschiedener Prozessparameter auf die Oxidationsgeschwindigkeit untersucht werden.

Das Oxidationsbecken, das mit Trägermaterial als Aufwuchskörper für die Mikroorganismen ausgestattet ist, besitzt ein Volumen von 22 m³ (Abb. 1). Das Volumen des Fällungsbeckens, welches für die Fällung und Sedimentation der Eisenschlämme konzipiert wurde, beträgt 7,9 m³. Der Wendelbelüfter und die Umwälzpumpe treiben den Wasserkreislauf an. In das Oxidationsbecken wird Kippengrundwasser aus dem Brunnen HK1 gepumpt, dessen Wasserqualität im Zeitraum zwischen Dezember 2000 bis Januar 2002 (Tab. 1) mehrfach analysiert wurde.

Tab. 1: Wasserqualität des gehobenen Brunnenwassers im Zeitraum 12/00-01/02 (GLOMBITZA 2002).

Parameter	Analyseverfahren (DIN)	Einheit	Mittelwert
pH-Wert			4,87
T		°C	17,3
Redoxpotential		mV	273
TIC	EN 1834	mg/l	98
TOC	EN 1834	mg/l	50
Sulfat	EN ISO 10304	mg/l	2680
Eisen II	38406-E1-1	mg/l	629
Eisen III	38406-E1-1	mg/l	3
NH ₄ ⁺	38406-E5-1	mg/l	0,58
o-PO ₄ ³⁻	EN 1189	mg/l	1,2
Cl ⁻	EN ISO 10304	mg/l	21,4

**Abb. 1: Prinzipschema der Versuchsanlage zur biologischen Oxidation von zweiwertigem Eisen und Ausfällung von Eisenhydroxysulfaten. Die Zahlen 1 bis 3 markieren Probenahmepunkte.**

Zusätzlich zum Kippengrundwasser, das mit einer durchschnittlichen Zuflussrate von 1800 l/h in das Oxidationsbecken gepumpt wird, werden über eine Membranpumpe ca. 2 mol/h Ammoniumchlorid und ca. 270 mmol/h Ammoniumphosphat dem Wasserkreislauf zugeführt, um eine Limitierung dieser Nährstoffe auszuschließen.

3 Durchführung

3.1 Probenahme

Die Versuchsanlage wurde nach In-Betrieblnahme zunächst ohne Wasserabfluss langsam mit Kippengrundwasser gefüllt. In diesem Zeitraum sank der pH-Wert im Oxidationsbecken auf ca. 2,8 ab. Nach Erreichen des maximalen Wasservolumens in der Versuchsanlage wurde der kontinuierliche Betrieb gestartet.

Die Probenahme erfolgte 19 Tage nach Aufnahme des kontinuierlichen Betriebes. In diesem Zeitraum wurde das Zulaufvolumen von 400 l/h auf 640 l/h erhöht. Dies entspricht einer Verringerung der Verweilzeit von ca. 75 h auf ca. 47 h. Zum Zeitpunkt der Probenahme betrugen der pH-Wert im Oxidationsbecken 2,98, das Redoxpotential 462 mV, die Temperatur 14,1 °C, die Konzentration an zweiwertigem Eisen 70 mg/l und die Konzentration an dreiwertigem Eisen 280 mg/l.

An den Probenahmepunkten 1 und 2 (Abb. 2) wurden jeweils ca. 15 g Feststoff und an den Punkten 2 und 3 jeweils 1 Liter Wasserprobe entnommen.

Die Wasserproben wurden mit einem Cellulosemembranfilter filtriert (Porengröße 0,45 µm, Roth).

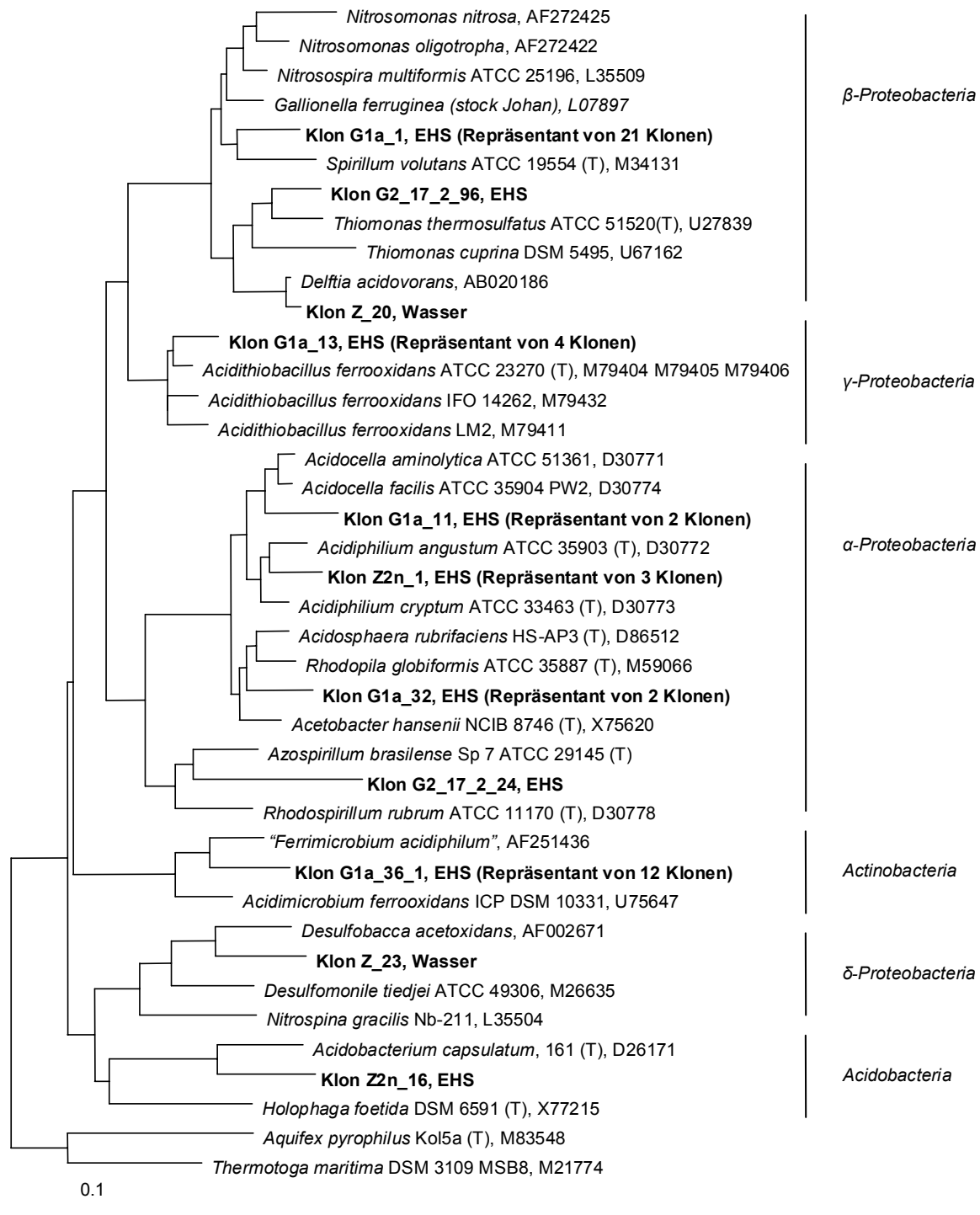


Abb. 2: Dendrogramm zur Darstellung der phylogenetischen Einordnung der 16S rDNA-Klone. Die Berechnung des Dendrogramms erfolgte mit dem Parsimony-Verfahren. Durch den verwendeten Filter wurden ausschließlich Sequenzpositionen berücksichtigt, in denen mindestens 50 % der Sequenzen identisch waren. Bei Klonen mit der Bezeichnung EHS wurde die DNA aus den Feststoffproben extrahiert, bei Klonen mit der Bezeichnung Wasser wurde die DNA aus den Flüssigproben extrahiert.

3.2 DNA Extraktion

Die Feststoffproben wurden jeweils mit 6 ml Tris-HCl pH 9 und 20 µl Tween 20 (Roth) überschichtet und 15 min lang im Ultraschallbad (Elma) behandelt. Je 2 ml Überstand wurden in die DNA-Extraktion nach WILSON (2000) eingesetzt. Um eine vollständigere Extraktion der DNA aus den Feststoffproben zu erreichen, wurden diese anschließend mit Zirkoniumkugeln (0,1 mm, Biospec) versetzt und 3 min lang in der Schwingmühle (Retsch) bei 30 Hz aufgeschossen. Die Proben wurden erneut mit Tris-HCl pH 9 und Tween 20 überschichtet und 15 min lang im Ultraschallbad behandelt. Auch hiervon wurden je 2 ml Überstand in die DNA Extraktion nach WILSON (2000) eingesetzt.

Die Filter der Wasserproben wurden zerkleinert und jeweils ein halber Filter in die DNA Extraktion nach WILSON (2000) eingesetzt.

3.3 Erstellen und Analyse der 16S rDNA-Klonbank

Die Gene der 16S rRNA wurde mit den universellen Bakterienprimern 27F und 1387R (LANE 1991) amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden in den Vektor pBluescript SK (Stratagene) ligiert und die daraus resultierenden Plasmide in Hitzeschock-kompetente *Escherichia coli*-DH5α-Zellen transformiert.

Die Plasmide wurden mit dem FlexiPrep-Kit (Amersham) aufgereinigt und unter Verwendung des CycleReader Auto DNA Sequencing-Kits (Fermentas) mit den IRD800 markierten Primern 27F, 530F, 519R, 1387R, T3, und T7 sequenziert. Die Sequenzierung erfolgte mit einem LICOR DNA Sequencer 4200.

Die Sequenzen der Klone wurden mit Hilfe des BLAST-Programms (ALTSCHUL *et al.* 1990) mit Sequenzdatenbanken abgeglichen. Die Zuordnung der Sequenzen zu homologen 16S rRNA-Sequenzbereichen verwandter Bakterien erfolgte mit Hilfe des ARB-Programms (LUDWIG *et al.* 2004) unter Berücksichtigung der Sekundärstruktur der rRNA. Die Berechnung des Dendrogramms erfolgte mit der Parsimony-Methode. Dabei wurden ausschließlich Sequenzpositionen berücksichtigt, in denen mindestens 50 % der Sequenzen identisch waren.

4 Ergebnisse

Die 49 bisher untersuchten Klone konnten durch Abgleich der Sequenzen mit der Sequenzdatenbank mit Hilfe des BLAST-Programms in 11 Gruppen unterteilt werden. Ein repräsentativer Klon aus jeder Gruppe wurde im Dendrogramm (Abb. 2) dargestellt.

Die meisten Sequenzen zeigen die größte Übereinstimmung mit unkultivierten Bakterien, die in verschiedenen Bergbauwässern nachgewiesen wurden. Die Klonbank wird von zwei Sequenztypen, Typ G1a_1 und G1a_36_1 (Tab. 2), dominiert.

Der Sequenztyp G1a_1 (43 % der Klonbank) kann phylogenetisch in die Ordnung der *Nitrosomonadales* eingeordnet werden. Bei Untersuchungen in einer Kupfermine in Wales dominierte das Bakterium MPKCSC9, das im BLAST-Datenbank-Abgleich die größte Übereinstimmung zu Klon G1a_1 aufwies, mit einem Anteil von > 90% die mikrobielle Lebensgemeinschaft. Bei Anreicherungsversuchen zeigte Bakterium MPKCSC9 autotrophes Wachstum auf Eisensulfat (HALLBERG *et al.* 2006). Über weitere physiologische Eigenschaften dieses Bakteriums liegen jedoch noch keine Erkenntnisse vor. Die im Dendrogramm (Abb. 2) dargestellte Zuordnung des Klons G1a_1 in die Familie der *Spirillaceae* ist aufgrund der relativ großen evolutionären Distanz zum ähnlichsten kultivierten Verwandten nicht eindeutig gesichert. Das zu Klon G1a_1 ähnlichste kultivierte Bakterium aus der Familie der *Spirillaceae* ist *Spirillum volutans* (88 % identische Positionen), ein microaerophiles chemoheterotrophes Bakterium, das in stehenden Gewässern weit verbreitet ist. Aus der Familie der *Gallionellaceae* ist *Gallionella ferruginea*, ein autotrophes mikroaerophiles Eisen oxidierendes Bakterium, der ähnlichste Vertreter (89 % identische Positionen) zu Klon G1a_1. *G. ferruginea* bevorzugt einen pH-Bereich von 5,0-6,5 und ist auch zu mixotrophem Stoffwechsel befähigt. *G. ferruginea* ähnliche Bakterien sind nach COUPLAND & JOHNSON (2004) in sauren Bergbauwässern weit verbreitet. Aus der Familie der *Nitrosomonadaceae* ist *Nitrosospora multiformis*, ein Ammonium oxidierendes autotrophes Bakterium, der ähnlichste Vertreter (91 % identische Positionen).

N. multiformis ist häufig in mikrobiellen Lebensgemeinschaften von Waldböden und Grünflächen vertreten und wurde ebenfalls aus sauren Böden (pH 4–4,5) isoliert (BRENNER *et al.* 2005).

Tab. 2: Zuordnung der Klone durch Abgleich mit der Sequenzdatenbank mit Hilfe des BLAST-Programms.

ähnlichste Referenz (GenBank accession no.)	Anzahl der Klone	% identische Positionen	Ordnung bzw. Phylum	Repräsentant im Dendrogramm
unkultiviertes Bakterium MPKCSC9 (AY766004) Quelle: AMD Kupfermine, Wales	21	94-97	<i>Nitrosomonadales</i>	Klon G1a_1
unkultiviertes Bakterium TRA2-10 (AF047642) Quelle: AMD Iron Mountain, CA	12	96-98	<i>Actinobacteria</i>	Klon G1a_36_1
<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> Stamm YTW (DQ062116)	4	95-99	<i>Acidithiobacillales</i>	Klon G1a_13
<i>Acidocella</i> sp. DM2 (DQ419948) Quelle: AMD	2	95-96	<i>Rhodospirillales</i>	Klon G1a_11
<i>Acidisphaera</i> sp. NO-15 (AF376024) Quelle: AMD Kupfermine, Norwegen	2	98-99	<i>Rhodospirillales</i>	Klon G1a_32
<i>Thiomonas</i> sp. DM-Zn2 (DQ419967) Quelle: AMD	1	97	<i>Burkholderiales</i>	Klon G2_17_2_96
<i>Acidiphilium</i> sp. NO-17 (AF376026) Quelle: AMD Kupfermine, Norwegen	3	97	<i>Rhodospirillales</i>	Klon Z2n_1
unkultiviertes Bakterium AKAU3770 (DQ125686) Quelle: Uran kontaminierter Boden	1	95	<i>Rhodospirillales</i>	Klon G2_17_2_24
<i>Acidobacteriaceae</i> isolate WJ7 (AY096034) Quelle: constructed wetland zur Sanierung von Bergbauwässern	1	97	<i>Acidobacteriales</i>	Klon Z2n_16
unkultiviertes Bakterium 65507 (DQ404734) Quelle: Sediment	1	96	<i>Syntrophobacterales</i>	Klon Z_23
<i>Delftia acidovorans</i> (AB020186)	1	98	<i>Burkholderiales</i>	Klon Z_20

AMD: acid mine drainage

Der Sequenztyp G1a_36_1 (25 % der Klonbank) besitzt als ähnlichsten kultivierten Verwandten das Actinobakterium „*Ferrimicrobium acidiphilum*“ (91 % identische Positionen mit Klon G1a_36_1). „*Ferrimicrobium acidiphilum*“ ist ein heterotropher acidophiler Eisenoxidierer, der in zahlreichen sauren Bergbauwässern nachgewiesen wurde (GONZALEZ-TORIL *et al.* 2003, COUPLAND & JOHNSON 2004). „*Ferrimicrobium acidiphilum*“, derzeit noch nicht offiziell als Art beschrieben, ist unter anaeroben Bedingungen zur Eisenreduktion befähigt (COUPLAND & JOHNSON 2004). Es weist ähnlich hohe Eisenoxidationsraten wie chemolithotrophe Eisenoxidierer, zum Bsp. *Acidithiobacillus ferrooxidans* auf (BLAKE & JOHNSON 2000) und benötigte bei Kultivierungsversuchen Hefeextrakt als Kohlenstoffquelle (JOHNSON *et al.* 1992).

Nur vier Klone, Repräsentant Klon G1a_13, zeigen die größte Ähnlichkeit zu dem bekannten Eisenoxidierer *Acidithiobacillus ferrooxidans* (91 % identische Positionen), einem chemolitho-autotrophen Bakterium, das als Elektronendonator

neben zweiwertigem Eisen auch reduzierte Schwefelverbindungen und Wasserstoff nutzen kann (DROBNER *et al.* 1990). Dieses Bakterium ist fakultativ anaerob und kann unter anaeroben Bedingungen die Oxidation reduzierter Schwefelverbindungen an die Reduktion von dreiwertigem Eisen koppeln (BLAKE & JOHNSON 2000).

Verschiedene Klone sind ähnlich zu nicht Eisen oxidierenden acidophilen Heterotrophen, wie *Acidocella*, *Acidiphilium*, *Acidosphaera* und *Acidobacterium*. Diese Bakteriengruppen sind ebenfalls charakteristisch für saure Bergbauwässer und wurden in verschiedenen anderen Studien nachgewiesen (HALLBERG *et al.* 2006, JOHNSON *et al.* 2001). Untersuchungen ergaben, dass Mischkulturen von autotrophen Eisenoxidierern und heterotrophen Mikroorganismen höhere Eisenoxidationsraten aufwiesen als Reinkulturen autotropher Eisenoxidierer (OKIBE & JOHNSON 2003).

Klon Z_20 besitzt Ähnlichkeit zu *Delftia acidovorans*, einem neutrophilen heterotrophen Bakte-

rium, das bisher nicht in sauren Bergbauwässern nachgewiesen wurde.

Klon G2_17_2_96 ist ähnlich zu *Thiomonas thermosulfatus* (91 % identische Positionen), das sowohl reduzierte Schwefelverbindungen und elementaren Schwefel, als auch organische Kohlenstoffverbindungen als Elektronendonator nutzen kann. Es bevorzugt ein schwach saures Milieu. Kultivierungsversuche mit einem *Thiomonas* verwandten Bakterium, isoliert aus einer Kupfermine in Wales, zeigten, dass dieses Bakterium neben Thiosulfat auch zweiwertiges Eisen und Arsenit oxidieren konnte (HALLBERG *et al.* 2006).

Klon G2_17_2_24 gehört zur Familie der *Rhodospirillaceae*, weist jedoch eine erhebliche evolutionäre Distanz zu dem nächst verwandten kultivierten Bakterium, dem Stickstoff fixierenden *Azospirillum brasiliense* auf (83 % identische Positionen), sodass keine Aussagen über die Physiologie getroffen werden konnten.

Klon Z_23 besitzt 89 % identische Positionen mit *Desulfobacca acetooxidans*, einem neutrophilen Anaerobier, welcher ausschließlich Acetat als Kohlenstoffquelle nutzen kann und dabei Sulfat und andere Schwefelverbindungen zu Schwefelwasserstoff reduziert.

5 Fazit

Während in Anlagen zur Eisenoxidation unter sauren Bedingungen allgemein *Leptospirillum ferrooxidans* und *Acidithiobacillus ferrooxidans* erwartet werden, spielen sie in der untersuchten Pilotanlage scheinbar keine größere Rolle. Während wenige zu *A. ferrooxidans* ähnliche Klone gefunden wurden, konnte *L. ferrooxidans* nicht nachgewiesen werden. Vielmehr konnten zahlreiche Klone in die Ordnung der *Nitrosomonadales* eingeordnet werden oder sie wiesen Ähnlichkeit zu „*Ferrimicrobium acidiphilum*“ auf. Somit sind die zwei dominierenden Bakteriengruppen in der untersuchten Pilotanlage nach phylogenetischer Einordnung zum einen zur autotrophen und zum anderen zur heterotrophen Eisenoxidation befähigt.

Danksagung

Diese Untersuchungen werden im Rahmen des BMBF Verbundprojektes „EHS - Gewinnung und Verwertung“ durchgeführt. Weitere Projektpartner sind: Vattenfall Europe Mining, TU Berlin und Ingenieurbüro KBE.

Literaturverzeichnis

- ALTSCHUL, S.F., GISH, W., MILLER, W., MYERS, E.W., LIPMAN, D.J., (1990): Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215: 403-410.
- BLAKE II R. & JOHNSON D.B. (2000): Phylogenetic and biochemical diversity among acidophilic bacteria that respire on iron. In: LOVLEY, D.R. (Hrsg.): *Environmental Microbe-Metal Interactions*. S. 53-78, ASM Press, Washington DC.
- BRENNER, D.J., KRIEG, N.R., STALEY, J.T. (2005): The Proteobacteria, Part C The Alpha-, Beta-, Delta-, and Epsilonproteobacteria. In: GARRITY, G.M. (Hrsg.): *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol. 2, 2. Auflage, Springer Verlag, US.
- COUPLAND, K. & JOHNSON, D.B. (2004): Geochemistry and microbiology of an impounded subterranean acidic water body at Mynydd Parys, Anglesey, Wales. *Geobiology* 2: 77-86.
- DROBNER, E., HUBER, H., STETTER, K.O. (1990): *Thiobacillus ferrooxidans*, a facultative hydrogen oxidizer. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 2922-2923.
- GLOMBITZA, F. (2002): Abschlussbericht – Einfluss der Prozessbedingungen und der Wasserqualität bei der Eisenoxidation und –abtrennung auf die Zusammensetzung der Eisenpigmente für die Verwendung in der keramischen Industrie. unveröffentlicht.
- GONZALEZ-TORIL, E., LLOBET-BROSSA, E., CASAMAYOR, E.O., AMANN, R., AMILIS, R. (2003): Microbial ecology of an extreme acidic environment, the Tinto River. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 4853-4865.
- HALLBERG, K.B., COUPLAND, K., KIMURA, S., JOHNSON, D.B. (2006): Macroscopic streamer growth in acidic, metal-rich mine water in North Wales consist of novel remarkably simple bacterial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 2022-2030.
- JOHNSON, D.B., GHOURI, M.A., SAID, M.F. (1992): Isolation and characterization of an acidophilic, heterotrophic bacterium capable of oxidizing ferrous iron. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 1423-1428.
- JOHNSON, D.B., ROLFE, S., HALLBERG, K.B., IVERSEN, E. (2001): Isolation and phylogenetic characterisation of acidophilic microorganisms indigenous to acidic drainage waters at an abandoned Norwegian copper mine. *Environ. Microbiol.* 3: 630-637.
- LANE, D.J. (1991): 16S/23S rRNA sequencing. In: STACKEBRANDT, E. & GOODFELLOW, M. (Hrsg.): *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*. John Wiley & Sons, Chichester, UK.
- LUDWIG, W., STRUNK, O., WESTRAM, R., RICHTER, L., MEIER, H., YADHUKUMAR, BUCHNER, A., LAI, T., STEPLI, S., JOBB, G., FÖRSTER, W., BRETTSCHE, I., GERBER, S., GINHART, A.W., GROSS, O., GRUNMANN, S., HERMANN, S., JOST, R., KÖNIG, A., LISS,

- T., LÜBMANN, R., MAY, M., NONHOFF, B., REICHEL, B., STREHLOW, R., STAMATAKIS, A., STUCKMANN, N., VILBIG, A., LENKE, M., LUDWIG, T., BODE, A., SCHLEIFER, K.H. (2004): ARB: a software environment for sequencing data. *Nucleic Acids Res.* 32: 1363-1371
- OKIBE, N. & JOHNSON, D.B. (2004): Biooxidation of pyrite by defined mixed cultures of moderately thermophilic acidophiles in pH-controlled bioreactors: significance of microbial interactions. *Biotechnol. Bioeng.* 87: 574-583.
- WILSON K. (2000): Preparation of genomic DNA from bacteria. In: ASUBEL, F.M., BRENT, R., KINGSTON, R.E., MOORE, D.D., SEIDMANN, J.G., SMITH, J.A., STRUHL, K. (Hrsg): *Current Protocols in Molecular Biology*. S. 2.4.1-2.4.5, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., USA.