

# Batchversuche zur Sulfatreduktion durch autotrophe Mikroorganismen im natürlichen Grundwasserleiter – Gegenwärtiger Stand

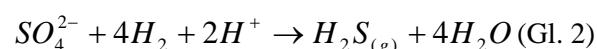
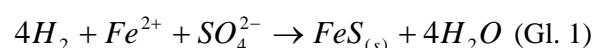
Felix Bilek

Dresden Grundwasserforschungszentrum e.V., Meraner Straße 10, 01217 Dresden, fbilek@dgfz.de

---

## 1 Einleitung und Problemstellung

Die autotrophe mikrobielle Sulfatreduktion stellt eine Möglichkeit dar, in stark schwefelsauren bergbaubeeinflussten Wässern die Schwefel-, Eisen- und damit die Aziditätslasten abzureichern. Hierzu kann dem Wasser das aziditätstragende Eisen als FeS durch Fällung entzogen (Gl. 1) und das überschüssige Sulfid als  $H_2S_{(g)}$  ausgestript werden (Gl. 2).



Für die Fällung der Eisensulfide im Untergrund (natürliches Festbett) ist sicherzustellen, dass den Mikroorganismen neben dem Substrat alle weiteren Baustoffe und Nährelemente in ausreichendem Umfang zur Verfügung stehen und auch die sonstigen Prozessparameter die Sanierungsreaktionen ermöglichen. Weiterhin muss die Möglichkeit der langfristigen Deposition des Eisenmonosulfides im Reaktionsraum gewährleistet sein.

### 1.1 Eisensulfid-Fällung im Untergrund

Die Fällung der Eisensulfide im Untergrund ist attraktiv, da sie die aufwändige Abtrennung und Entsorgung des Eisensulfid-Schlammes überflüssig macht. Wird Wasserstoff als Elektronendonator eingesetzt, kann dieser über Gaslanzen direkt in den Untergrund injiziert werden, wo er Gasvorhänge aufbaut, die Substratspeicher für das vorbeiströmende Grundwasser darstellen (Latzik *et al.* 2002). Der sich in das strömende Grundwasser einlösende Wasserstoff wird zusammen mit den Problemstoffen zu den sessilen Mikroorganismen transportiert. Einige Sulfatreduzierende Bakterien sind autotroph und können Wasserstoff direkt für den Energiestoffwechsel verwenden (MADIGAN *et al.* 2003), so dass keine weiteren Abbau- und Umsetzungsprozesse zur Ge-

winnung des  $e^-$ -Donators nötig sind. Jedoch benötigen auch autotrophe Sulfatreduzierer Nährelemente wie Ammonium, Phosphat, Spurenelemente und zeigen möglicherweise bei Anwesenheit von organischem Kohlenstoff höhere Umsatzraten (TABAK & GOVIND 2003).

### 1.2 Konkurrenz durch methanogene Bakterien

Methanogene Bakterien (MB) stellen für Sulfatreduzierende Bakterien (SRB) potentielle Konkurrenten um Elektronendonatoren dar. Die Diskussion, darüber unter welchen Umständen MB als Konkurrenten zu SRB auftreten, ist in der Literatur noch nicht abgeschlossen. Nach OMIL *et al.* 1998 bestimmt das zur Inokulation verwendete Material in der Anfangsphase von Versuchen wesentlich deren Verlauf. Diskutiert wird die Inhibierung von MB durch  $H_2S(aq)$  (u.a. HULSHOFF POL *et al.* 1998) und da nur die Spezies  $H_2S(aq)$  als toxisch angesehen wird (u.a. LENS & HULSHOFF POL 2000), damit verbunden der pH-Wert, der die Sulfid-Spezierung bestimmt.  $H_2$  wird hauptsächlich von SRB genutzt, solange Sulfat nicht limitierend wird (z.B. VAN HOUTEN *et al.* 2006; WEIJMA *et al.* 2002). Nach OMIL *et al.* (1998), ISA *et al.* (1986) u.a. ist für die Konkurrenz zwischen MB und SRB das Corg/Sulfat-Verhältnis entscheidend: ist zu viel organische Substanz gegenüber Sulfat gegenwärtig, werden die MB dominant. Wenn Sulfat dagegen nicht limitierend ist, wird Wasserstoff vollständig von SRB umgesetzt (LENS & HULSHOFF POL 2000). Dann werden auch Methanbildner zurückgedrängt, da SRB beim Umsatz von Wasserstoff gegenüber diesen einen höheren Energiegewinn erzielen. Nach ISA *et al.* (1986) werden autotrophe SRB gegenüber MB jedoch **nur** bei entsprechend niedrigen  $H_2$ -Partialdrücken ( $<50 \mu\text{mol H}_2$ ) bevorteilt. Bei höheren Konzentrationen werden Methanbildner durch  $H_2$ -Konzentrationen bevorteilt. Auch AVASIDIS (1990) beschreibt die Zunahme der Methanbildung aus  $H_2$  und  $CO_2$  bei hohen Wasserstoffpartialdrücken.

**Tab. 1: Geometrische Daten der Batch-Gefäße.**

<b>Batch-Gefäß Geometrische Daten</b>		
Gesamtlänge Hohlraum	50	cm
Länge Sedimentkörper	27	cm
Länge Gasraum	21	cm
Einbauten	2	cm
Durchmesser	8	cm
Vol. Sedimentkörper	1357	cm <sup>3</sup>
Vol. Gasraum	672	cm <sup>3</sup>
Porenlösung	400	ml

Vor dem Hintergrund des beschriebenen Erkenntnisstandes scheint die Frage der Konkurrenz zwischen SRB und MB um H<sub>2</sub> im Festbett nur für den konkreten Einzelfall klärbar zu sein.

## 2 Untersuchungsziel

Es wurden Batch-Versuche im silikatischen Festbett zur Untersuchung der Abhängigkeit der Sulfat-Umsatzraten von Temperatur, sowie der Gabe von Nährstoffen und Spurenelementen unter möglichst natürlichen Bedingungen durchgeführt. Außerdem sollte festgestellt werden, ob und unter welchen Bedingungen autotrophe SRB Konkurrenz durch MB bekommen.

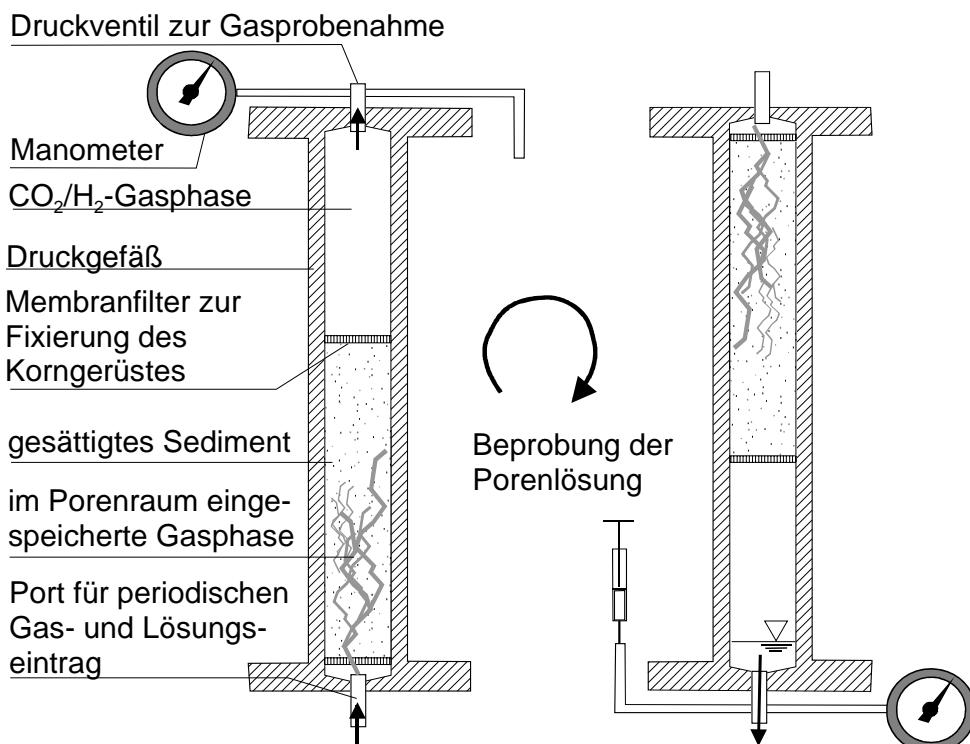
## 3 Versuchsaufbau

Für die Batchversuche wurde natürliches anoxisches sulfat- (ca. 17 mmol/l) und Fe(II)-reiches

(ca. 4 mmol/l) Grundwasser mit pH 4,8±0,1 verwendet, welches in 50 L-Edelstahlfässern für etwa 4 Wochen unter Schutzgasatmosphäre lagerbar war. Die Edelstahlfässer wurden dazu mindestens 30 Minuten lang mit einer definierten Atmosphäre, bestehend aus 95% Stickstoff und 5 % Kohlendioxid, gespült. Die Zusammensetzung des Gasgemisches wurde so gewählt, dass der anorganische Kohlenstoff im Grundwasser mit dem Kohlendioxidpartialdruck in der künstlichen Atmosphäre im Gleichgewicht steht.

Die Batch-Versuche fanden in Druckgefäßen statt, da auch im Feld der in die gesättigte Zone zu injizierende Wasserstoff durch den dort höheren Druck in stärkerem Maße gelöst werden wird. Der Aufbau der Druckgefäße ist in Tabelle 1 und Abbildung 1 dargestellt.

An der Ober- und Unterseite wurden Ventile installiert, über die Gas (95 Vol% H<sub>2</sub>, 5 Vol%

**Abb. 1: Aufbau und Funktion der Batch-Gefäße.**

$\text{CO}_2$ ) und Wasser entnommen bzw. injiziert wurde. Der Innenraum der Batches wurde zweigeteilt. Nur der untere Bereich war mit wasser gesättigtem reinem Sand (0,2-0,7 mm) gefüllt, um  $\text{C}_{\text{org}}$ -Gehalte des Sedimentes zu minimieren

Im Gasraum über dem Sedimentkörper, durch eine Filtermembran von diesem getrennt, befand sich die  $\text{CO}_2/\text{H}_2$ -Gasphase. Diese wurde genau wie der Gasvorhang im Sediment täglich erneuert, um eine optimale Elektronendonator-Versorgung zu gewährleisten und um mit dem Gasstrom im Korngerüst eine konvektive Bewegung der fluiden Phase analog zur Grundwasserströmung zu erzeugen. Die Batches wurden in einem Kühlcontainer entsprechend der Grundwassertemperatur mit 10°C gelagert.

### 3.1 Versuchsdurchführung

Die Beprobung und Aufstockung (Zugabe neuen noch unbehandelten Grundwassers) erfolgte durch konvektive Verdrängung des bisherigen Porenfluides. Es wurden 5 Batches mit autotrophen Sulfatreduzierern inkuliert, die aus gesättigtem Kippensediment gewonnen wurden. Sobald in allen 5 Batchgefäßen stabile Sulfatabauraten erreicht waren, wurden die Bedingungen für die einzelnen Populationen variiert:

Batch 1: (Referenz): wird ohne weitere Zusatzstoffe oder Parameteränderungen betrieben.

Batch 2: (Temperaturerhöhung auf 20°C)

Batch 3: Zugabe von Ammonium (0,93 mmol/l) und Phosphat (0,31 mmol/l). Zu untersuchen war, in wieweit die im natürlichen Grundwasser vorkommenden Ammonium- und Phosphatkonzentrationen für die aktive autotrophe Mikrobiologie limitierend sind. Bekannt ist, dass SRB im Gegensatz zu aeroben Mikroben Biomasse mit deutlich geringerer Geschwindigkeit aufzubauen (Röske & Uhlmann, 2005), so dass ein entsprechend geringerer N- und P-Bedarf pro Zeit erwartet wurde. Da typische Grundwässer bergbaueinflusster Gebiete jedoch oft sehr geringe

N (Amm-N 0,0 – 0,2 mmol/l) und P-Gehalte (Orthophosphat-P 0,0 - 0,015 mmol/l) aufweisen, muss zumindest bis zum Aufbau einer stabilen Klimax-Population mit einer Limitierung gerechnet werden.

Batch 4: (Zugabe von Vitaminen und Spurenstoffen): Für den Biomasseaufbau werden neben den Hauptelementen auch Spurenstoffe und komplexe organische Substanzen benötigt, wie sie in Nährösungen zur Anzucht von Mikroorganismen verwendet werden. Ob ein Spurenelementmangel in der Phase der Sedimentkörperbesiedelung einen limitierenden Faktor darstellt, sollte mit der Zugabe von Spurenstoffen und Vitaminen nach HERRERA *et al.* (1997) untersucht werden.

Batch 5: Um eine mögliche Ratenlimitierung durch mangelnde  $\text{H}_2$ -Verfügbarkeit im Sediment nachweisen zu können, wurde Batch 5 ungesättigt betrieben, so dass ein größeres  $\text{H}_2$ -Gasvolumen im Sedimentkörper zur Verfügung stand.

Nach 90 Tagen wurde die N und P-Zugabe für Batch 3 eingestellt, Batch 2, 4 und 5 wurden ab dann mit Ammonium (0,93 mmol/l) und Phosphat (0,31 mmol/l) beaufschlagt. Nach 170 Tagen wurden die Versuche beendet und die Batches geöffnet.

Die Beprobung erfolgte wöchentlich und bei höheren Umsatzraten im Abstand von 2 bis 4 Tagen. Sulfat wurde mittels Ionenchromatographie (Dionex DX500) bestimmt. Die Eisen(II)-Bestimmung erfolgt mit einem Spektrophotometer.

## 4 Ergebnisse

In sämtlichen mit  $\text{H}_2$  beaufschlagten Batches kann sowohl Eisen(II) als auch Sulfat bei entsprechender Standzeit vollständig entfernt werden. Die Eisensulfidfällung findet homogen verteilt im gesamten Sedimentkörper statt. Das nach 170 Tagen ausgebauten Sediment war im Unter-

**Tab. 2: Methankonzentrationen als prozentualer Anteil der gesamten anfallenden Gasphase nach 90 und 170 Versuchstagen.**

Methananteil in Gasphase		90 Tage	170 Tage
		[%]	[%]
Batch 1		0,45	n.b.
Batch 2		0,14	0,027
Batch 3		<0,02	<0,02
Batch 4		<0,02	n.b.
Batch 5		0,03	n.b.

schied zum ursprünglichen Sediment schwarz und stark bindig.

Abbildung 2 zeigt die im Versuchsverlauf bestimmten Raten. Die Sulfatreduktions- und Eisenfällungsrate wurde aus der Abnahme der jeweiligen Konzentrationen in Lösung berechnet. Tabelle 2 zeigt die in der Gasphase bestimmten Methankonzentrationen.

Alle Batches zeigen durch die Sulfatreduktion eine pH-Anhebung vom Zulauf-pH  $4,88 \pm 0,1$  auf Werte von 6,7 bis 7 bei Beginn der Versuche und dann eine Abnahme auf 6,4 bis 5,7 im Laufe der Versuche. Nach ca. 90 Tagen wurde in allen Batches ein teilweise starker Rückgang der Sulfatelimination festgestellt, während die Eisenelimination trotz nachlassender Sulfidbildung konstant blieb.

Batch 1 (Referenz) zeigt zu Beginn der Versuche Sulfatreduktionsraten von ca. 0,02 bis 0,05 mmol/(l\*h). Diese Rate ist vergleichbar mit den in der Literatur angegebene Umsätzen bei Einsatz heterotropher Sulfatreduzierer und organischer Elektronendonatoren.

Batch 2 (Temperaturerhöhung auf 20°C) zeigt eine Verdoppelung bis Verdreifachung der Raten auf ca. 0,06 mmol/(l\*h). Diese Steigerung entspricht dem in der Literatur (z.B. RÖSKE & UHLMANN 2005) beschriebenen Verhalten: Bei einer Steigerung der Temperatur um 10 K erfolgt demnach etwa eine Verdoppelung der Raten.

Batch 3 (N und P-Zugabe) zeigt bei 10°C einen Anstieg auf ca. 0,2 mmol/(l\*h). Damit scheint die zusätzliche Stickstoff- und die Phosphor-Zufuhr für die Stoffwechselaktivitäten der Mikroorganismen von Bedeutung zu sein. Die im Grundwasser vorhandenen geringen N- und P-Mengen reichen für eine maximale Umsatzrate nicht aus.

Batch 4 (Zugabe von Spurenstoffen und Vitaminen): Die dem Referenzbatch entsprechenden Raten zeigen, dass das Festbett genügend Spurenstoffe für den Zellaufbau nachliefert bzw. diese im Grundwasser mitgeführt werden. Ebenso scheinen die für den Metabolismus benötigten komplexeren organischen Moleküle durch die SRB selbst hergestellt werden zu können oder im verwendeten Grundwasser vorhanden zu sein.

Batch 5 (ungesättigter Betrieb) zeigte keine gegenüber dem Referenzbatch erhöhten Umsatzraten. Die erzwungene erhöhte Gasbevorratung im Festbett scheint damit nicht von Bedeutung für den H<sub>2</sub>-Umsatz zu sein.

## 5 Diskussion

### 5.1 Ratenentwicklung

Mit einer für die Versuchsergebnisse repräsentativen Rate von 0,03 mmol/(l\*h) müsste ein Wasser im Untergrund mit einer Sulfatkonzentration von 17 mmol/l in einem Zeitraum von 24 Tagen abgereinigt werden. Diese Zeitspanne entspricht bei einer Abstandsgeschwindigkeit von 1 m/d einem Untergrundreaktor mit der Länge von 24 m. Der in einem solchen Untergrundreaktor für Fällungsprodukte zur Verfügung stehende Porenraum beträgt (mit  $\epsilon=0,3$ )  $7,2 \text{ m}^3$  pro  $\text{m}^2$  Anstromfläche. Bei Annahme einer Dichte von  $1\text{g}/\text{cm}^3$  für die FeS-Fällungsprodukte entspricht dies einem Porenraum, der in 44 Jahren vollständig verfüllt würde. Eine Beeinträchtigung der Durchlässigkeit ist jedoch wesentlich früher zu erwarten (siehe unten).

Die Abnahme der Sulfatreduktion nach ca. 100 Tagen geht mit einer allmählichen Abnahme der pH-Werte einher und deutet auf ein Nachlassen der mikrobiellen Umsatzleitung hin. Geringe Methankonzentrationen im Gasraum der Batches (Tab. 2) auch nach 170 Tagen lassen eine zunehmende Konkurrenz durch MB für die SRB als unwahrscheinlich erscheinen. Die gleichzeitig anhaltende Elimination von Eisen(II) kann auf die Sorption von Fe(II) an FeS-Präzipitaten zurückzuführen zu sein, wie sie von Jong & Parry (2004) beschrieben wird. Die Zusammensetzung des Präzipitates soll nun durch einen Aufschluss der Sedimente untersucht werden.

Die makroskopisch beobachtbare Veränderung des Sedimentes lässt es möglich erscheinen, dass die Abnahme der Raten auf die Abnahme der Permeabilität durch Präzipitatbildung zurückzuführen ist. Diese Möglichkeit wird momentan näher untersucht, indem ein Teil des Sedimentes aus den Batches entfernt und durch frisches Sediment ersetzt wurde, so dass wieder gut zugänglicher Porenraum als Reaktions- und Speicherraum zur Verfügung steht. Maximal (Batch 3) wurden im bisherigen Versuchszeitraum 58 mmol Fe(II) in die Batches eingebracht. Unter der Annahme, dass diese Eisenmenge als FeS (Molmasse 87,9 g/mol) im Sediment vorliegt und eine Dichte von 1-3 g/cm<sup>3</sup> aufweist, kann ein in Anspruch genommener Porenraum von ca. 1,7-5 ml abgeschätzt werden. Dies ist gering im Vergleich zum ursprünglich vorhandenen Porenraum von 400 ml (Tab. 1) und kann eine Transportlimitierung durch Verblockung des Porenraumes

nur erklären, wenn ein wesentlicher Teil des Präzipitates aus Biomasse besteht.

Auch die zunehmende Umkrustung der SRB selbst kann nach UTGIKAR *et al.* (2002) zu einer Limitierung des Stoffaustausches mit dem freien Porenwasser führen, wodurch die Umsatzraten deutlich sinken. Die in den Batches 2, 4 und 5 auch durch zusätzliche N- und P-Zugabe nach 90 Tagen nicht mehr steigerbaren Raten legen einen oder beide Effekte nahe.

## 5.2 Bedarf an Ammonium und Phosphat

N und P werden von den Mikroorganismen hauptsächlich für den Baustoffwechsel, nicht jedoch für den Energiestoffwechsel benötigt. Demnach sollten erhöhte Zelldichten (Zellzahl/Sedimentvolumen) zu den gesteigerten Raten in Batch 3 geführt haben. Dieser zeigte nach N- und P-Zugabe (Batch 3) im Zeitraum 70 bis 100 Tage mit Abstand die größten Raten. Die in den anderen Batches bestimmten Raten zeigen dagegen keinerlei Zunahme mit der Zeit, so dass die Zu-

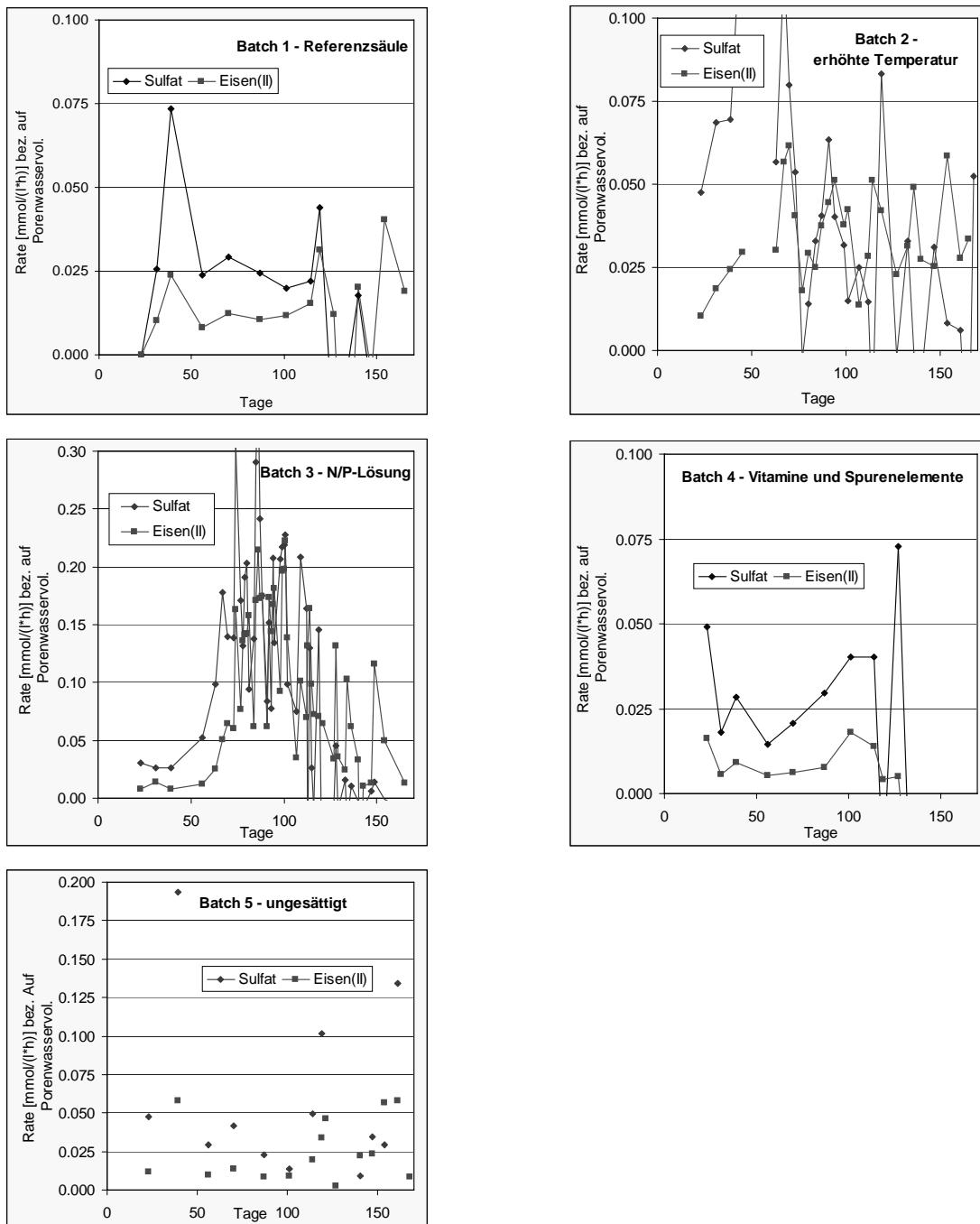


Abb 2: Entwicklung der Sulfatreduktions- und Fe(II)-Fällungsraten der Batchansätze.

nahme der Biomasse mit der Zeit nicht anzunehmen ist. Dies wäre jedoch zu erwarten, wenn N und P mit einer kontinuierlichen aber geringeren Rate über das Grundwasser oder das Sediment nachgeliefert wurden und in der aktiven Biomasse akkumuliert würden. Die Ratenentwicklung spricht jedoch für ein Fließgleichgewicht, in welchem der Eintrag dem Austrag entspricht. Dies kann durch Austrag aus dem Reaktionsraum geschehen oder aber durch Umkrustung und Inertisierung der N- und P-haltigen Biomasse wie oben beschrieben.

Werden P und N im System recycled (N und P aus absterbenden Zellen also wieder neuen Zellen zugänglich gemacht), so wird die erreichte Rate nach Absetzen der N und P-Zugaben nur langsam abnehmen. Werden N und P dagegen schnell aus dem aktiven Stoffwechsel entfernt, so sollte die Rate schnell wieder auf das Niveau des Referenzbatches 1 absinken. Die im Batch 3 beobachtete Sulfatreduktionsraten-Abnahme nach dem Absetzen der N- und P- Zugaben ist wahrscheinlich durch die Abnahme der Sediment-Permeabilität überprägt.

Die Abnahme der Zugänglichkeit der SRB im Festbett lässt die Möglichkeit einer Abreinigung des Reaktionsraumes attraktiv erscheinen. Diese kann nur in einem technischen Reaktor durchgeführt werden. Die in den Versuchen durch Temperaturerhöhung und N- und P- Zugabe erreichbaren Ratensteigerungen sind ebenfalls nur in technischen Reaktoren realisierbar. Durch eine Kombination von Abreinigung, Temperaturerhöhung und optimaler Nährstoffversorgung erscheinen hier Raten bis zu 1 mmol(l<sup>-1</sup>h) erreichbar.

## 6 Danksagung

Die dargestellten Arbeiten wurden im F&E-Projekt „Stärkung des Entwicklungspotenzials von Bergbaufolgelandschaften durch den Schutz von Oberflächengewässern vor schwefelsauren Grundwasserzuflüssen mittels reaktiver Reinigungswände“ erarbeitet. Das Projekt wird von der LMBV mbH geleitet und teilfinanziert. Die weitere Finanzierung erfolgte über das BMBF. Beiden Institutionen sei hier für die gemeinschaftliche Finanzierung und inhaltliche Unterstützung gedankt.

## 7 Literatur

AIVASIDIS, A. (1990): Bioverfahrenstechnische Aspekte der anaeroben Abwasserreinigung. *EntsorgungsPraxis* **7-8/90**, 433-443.

HERRERA, L., HERNANDEZ, J., BRAVO, L., VERA, L. (1997): Biological process for sulfate and metals abatement from mine effluents. *Environmental Toxicology and Water Quality*. **12**, 101-107.

HULSHOFF POL, L.W., LENS, P.N.L., STAMS, A.J.M., LETTINGA, G. (1998): Anaerobic treatment of sulphate-rich wastewaters. *Biodegradation* **9**, 213-224.

ISA, Z., GRUSENMAYER, S., VERSTRAETE, W. (1986): Sulfate reduction relative to methane production in high-rate anaerobic digestion: Technical aspects. *Applied and environmental Microbiology*. **51**(3), 572-579.

JONG, T., PARRY, D.L. (2004): Adsorption of Pb(II), Cu(II), Cd(II), Zn(II), Ni(II), Fe(II), and As(V) on bacterially produced metal sulfides. *Journal of Colloid and Interface Science*. **275**, 61-71.

LAZIK, D., GEISTLINGER, H., KRAUSS, G., BECKMANN, A., SCHIRMER, M. (2002): Untersuchungen zum Strömungsverhalten und zur Lösungskinetik von Gasen im Mehrphasensystem „Aquifer“, *Grundwasser*. **3**(7), 146-155.

LENS, P. N. L., HULSHOFF POL, L.: *Environmental Technologies to treat sulfur pollution*, IWA Publishing, London, 2000.

MADIGAN, M.T., MARTINKO, J.M., PARKER, K., *Biology of Microorganisms*, Prentice Hall, 10<sup>th</sup> Ausgabe, 2003.

OMIL, F., LENS, P., VISSER, A., HULSHOFF, POL L.W., LETTINGA, G. (1998): Long term competition between sulfate reducing and methanogenic bacteria in UASB-reactors treating volatile fatty acids. *Bio- tech. Bioeng.* **57**, 676-685.

RÖSKE, I., UHLMANN, D. (2005): *Biologie der Wasser- und Abwasserreinigung*. Ulmer Verlag Stuttgart.

TABAK, H.H., GOVIND, R. (2003): Advances in biotreatment of acid mine drainage and biorecovery of metals: 2. Membrane bioreactor system for sulfate reduction. *Biodegradation*. **14**, 437-452.

UTGIKAR, V.P., HARMON, S.M., CHAUDHARY, N., TABAK, H.H., GOVIND, R., HAINES, J.R. (2002): Inhibition of sulphate-reducing bacteria by metal sulphide formation in bioremediation of acid mine drainage. *Environmental Toxicology*. **17**, 40-48.

VAN HOUTEN, B. H. G. W., ROEST, K., TZENEVA, V.A., DIJKMAN, H., SMIDT, H., STAMS, A.J.M. (2006): Occurrence of methanogenesis during start-up of a full-scale synthesis gas-fed reactor treating sulphate and metal-rich wastewater. *Water Research*. **40**, 553-560.

WEIJMA, J., GUBBELS, F., HULSHOFF POL, L.W., STAMS, A.J.M., LENS, P., LETTINGA, G. (2002): Competition for H<sub>2</sub> between sulphate reducers, methanogens and homoacetogens in a gas-lift reactor. *Water Science and Technology*. **45**(10), 75-80.