

Aus dem Institut für Mikrobiologie der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald

Untersuchungen über das Verhalten von Thiobakterien gegenüber Schwermetallen

BRUNHILDE MARCHLEWITZ, DORIS HASCHE und W. SCHWARTZ

(Eingegangen am 1. 12. 60)

I. Einleitung

In einer früheren Arbeit (MARCHLEWITZ u. SCHWARTZ, 1960/61) haben wir über die Biocoenose der sauren Grubenwässer berichtet, deren Acidität zu einem erheblichen Teil auf die Lebenstätigkeit von *Thiobacillus thiooxidans* und *Th. ferrooxidans* zurückgeht. Das Biotop ist durch das Vorkommen sulfidischer Erze gekennzeichnet, die bei der Oxydation Schwermetallsulfate und, je nach der Gangart der Lagerstätte, freie Schwefelsäure oder sonstige Sulfate, z. B. Gips, liefern.

Da durch saure Grubenwässer erhebliche Korrosionsschäden verursacht werden, besteht ein großes wirtschaftliches Interesse daran, die Tätigkeit der Thiobakterien, von denen die Säurebildung im Vergleich zur nicht-biologischen Oxydation der Sulfide erheblich beschleunigt wird (LEATHEN u. BRALEY, 1953), auszuschalten. Auf die Schwierigkeiten eines solchen Vorgehens haben TEMPLE u. KOEHLER (1954) ausführlich hingewiesen. Auch von den begleitenden Pilzen ist in Bezug auf antagonistische Wirkung kaum etwas zu erwarten. Abschluß der Luft aus abgebauten, verlassenen Strecken, Kontrolle der Wasserbewegung und getrennte Ableitung der infizierten stark sauren Wässer scheinen zur Zeit die einzigen Hilfsmittel zu sein.

Abgesehen von der Säuretoleranz, zeichnen sich die hier vorkommenden Thiobakterien durch ein mehr oder weniger ausgeprägtes Adaptationsvermögen an Schwermetalle aus. Da die Schwermetalle im Laufe der Oxydationsprozesse mobilisiert werden und in Lösung gehen, ist an verschiedenen Stellen, z. B. in Cananea (Mexiko), in Bisbee (Arizona), im Ural und im Bingham Canyon (Utah) versucht worden, die sauren Thiobakterien-führenden Grubenwässer für das Leaching-Verfahren nutzbar zu machen (WILSON 1952, DAVIS 1953, BRYNER u. a. 1954, 1957, 1958, WEED 1956, ZIMMERLY u. a. 1958). Kupfererz-führende Schichten und Abraum, deren Kupfergehalt so gering ist, daß eine Verhüttung nicht lohnt, werden in Halden oder in besonderen Aufbereitungsanlagen mit Grubenwässern behandelt; dabei werden Eisen- und Kupfersulfide oxydiert; die Oxydation des Kupfers wird durch dreiwertiges Eisen beschleunigt. Aus den abfließenden Sulfat-haltigen Wässern kann Kupfer als „Zementkupfer“ abgeschieden werden. Bei diesen Vorgängen spielt das Adaptionsvermögen der Thiobakterien an die in Lösung vorliegenden Schwermetallsulfate eine Rolle. Außer Eisen und Kupfer sind Zink, Nickel, Blei und andere Metalle in den Lagerstätten in wechselnden Mengen vertreten.

Wir haben bis jetzt das Verhalten von *Thiobacillus thiooxidans* und *Th. ferrooxidans* gegenüber Eisen- und Kupfersulfiden und Eisen-, Kupfer- und Zinksulfat geprüft.

II. Methode

Was die Kultur der Thiobakterien, die Herkunft der einzelnen Stämme und die Kontrolle der Säurebildung betrifft, so kann auf unsere frühere Mitteilung in dieser Zeitschrift (MARCHLEWITZ u. SCHWARTZ, 1960/61) verwiesen werden.

Zur Prüfung auf Schwermetalltoleranz wurde der LE bzw. STA/S Nährlösung Eisen-, Kupfer- oder Zinksulfat in der gewünschten Menge zugesetzt. Wir impften zunächst jeden Stamm in drei Parallelen auf eine Reihe von fünf bis zehn Kölben mit zunehmender Schwermetallkonzentration. In wöchentlichen Abständen wurden Wachstum und Säureproduktion kontrolliert. Nach etwa sechs Wochen wurden von jedem Stamm die beiden Kulturen stärkster Toleranz ausgelesen und Subkulturen auf Nährlösungen mit der gleichen und der nächsthöheren Schwermetallkonzentration angelegt. Trat auch bei letzterer Wachstum ein, wurde in der nächsten Subkultur die Kupfer- bzw. Zinksulfatgabe weiterhin erhöht. Durch ständige Erhöhung der Schwermetallkonzentration in den Subkulturen gelang eine allmähliche Adaptation der Thiobakterien.

Die Kupferbestimmungen haben wir mit Natriumdiäthyldithiocarbamat in ammonikalischer Lösung vorgenommen (CALLAN u. HENDERSON 1929, MFARLANE 1932, THUN u. a. 1955). Die Absorptionsintensität des braunen Farbkomplexes wurde im Pulfrich-Photometer unter Verwendung des Filters S 66 gemessen. Höhere Kupferkonzentrationen wiesen wir über den Kupfertetramin-Komplex (JANDER u. WENDT 1954) nach.

III. Verhalten der Thiobakterien gegenüber einigen Schwermetallsulfaten

Eisen wurde als Ferrosulfatlösung den Stammlösungen STA/S bzw. LE nach der Sterilisation zugesetzt. Die Eisentoleranz von *Th. thiooxidans* und *Th. ferrooxidans* ist erheblich (Tab. 1 und 2), deshalb waren Adaptationsversuche nicht erforderlich.

Tabelle 1
Eisentoleranz der *Th. thiooxidans*-Stämme

Versuchsdauer 40 Tage

Es bedeuten: +++ sehr gutes Wachstum mit pH-Werten unter 1
 ++ gutes Wachstum mit pH-Werten von 1 bis 1,5
 + mäßiges Wachstum mit pH-Werten von 1,5 bis 3
 -- kein Wachstum

Stamm	Eisengehalt pro Liter der Nährlösung					
	160 mg	400 mg	800 mg	4 g	8 g	12 g
Bol 1	+++	+++	++	+	+	+
Bol 4	+++	++	+	--	--	--
Bol 5	+++	+++	++	--	--	--
K ₀	+++	+++	+++	++	++	+
Scot	+++	+++	+++	+++	++	+
Starkey 1	+++	+++	+++	++	+	+
Starkey 2	+++	+++	++	+	+	--
Starkey 3	+++	+++	+++	++	+	--

Wesentlich ausgeprägter als bei Eisensulfat sind die Unterschiede zwischen den beiden Arten und desgleichen zwischen verschiedenen Stämmen derselben Art im Verhalten gegenüber Kupfersulfat (Tab. 3 und 4). Wie gegenüber Eisen, erwies sich auch hier *Th. ferrooxidans* als widerstandsfähiger. Es zeigte sich im allgemeinen eine Beziehung der Kupferverträglichkeit zum ursprünglichen Standort des Bakterien-

stammes. Bei Isolierung von einem Schwermetall-armen Habitat, war die Kupfertoleranz gering; Stämme aus Kupfergruben (z. B. Bi 6 und Bol 3) erwiesen sich dage-

Tabelle 2

Eisentoleranz der *Th. ferrooxidans*-Stämme
Versuchsdauer 40 Tage

Es bedeuten:

- +++ sehr gutes Wachstum, pH 2,6 nach 10 Tagen erreicht
- ++ gutes Wachstum, pH 2,6 nach 20 Tagen erreicht
- + mäßiges Wachstum, pH 2,6 nach 40 Tagen erreicht

Stamm	Eisengehalt pro Liter der Nährlösung			
	800mg	4 g	8 g	12 g
Beck	+++	++	++	++
Bi 6	+++	++	++	++
Bol 3	+++	+++	+++	++
Fa 5	+++	+++	+++	+++
K 2	+++	+++	+++	++
Meg 5	+++	+++	++	++
Ram 2c	++	++	++	+
Scot	+++	++	++	+

Tabelle 3

Kupfertoleranz der *Th. thiooxidans*-Stämme

Versuchsdauer 40 Tage

Zeichenerklärung wie Tab. 1

Stamm	Kupfergehalt pro Liter der Nährlösung							
	250 γ	500 γ	2,5 mg	5 mg	25 mg	50 mg	250 mg	500 mg
Bol 1	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	—
Bol 4	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	—
Fa 5	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++
K _o	+++	+++	+++	+++	++	—	—	—
K 5	+++	+++	+++	+++	++	+	—	—
Meg 5	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+
Scot	+++	+++	+++	+++	++	+	—	—
Starkey 1	+++	++	—	—	—	—	—	—
Starkey 2	+++	++	++	—	—	—	—	—
Starkey 3	+++	+++	++	+	—	—	—	—

Tabelle 4

Kupfertoleranz der *Th. ferrooxidans*-Stämme

Versuchsdauer 40 Tage

Zeichenerklärung wie Tab. 2

Stamm	Kupfergehalt pro Liter der Nährlösung								
	2,5 mg	5 mg	25 mg	50 mg	250 mg	500 mg	2,5 g	5 g	10 g
Beck	+++	+++	++	+	+	—	—	—	—
Bi 6	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	—	—
Bol 3	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	—
Fa 5	+++	+++	+++	++	+	—	—	—	—
K 2	+++	+++	+++	++	—	—	—	—	—
Meg 5	+++	+++	+++	+++	++	+	+	—	—
Ram 2c	++	++	+	—	—	—	—	—	—
Scot	+++	++	+	—	—	—	—	—	—

gen als sehr kupfertolerant. Diese Beziehung blieb in den meisten Fällen auch während der Adaptationsversuche erhalten (Tab. 5).

Es gelang im Laufe von zwölf Subkulturen einige Stämme an das Mehrfache der anfangs tolerierten Kupferkonzentration zu adaptieren (Tab. 5).

Tabelle 5
Adaptation von *Th. thiooxidans* und *T. ferrooxidans*
an höhere Kupferkonzentrationen

<i>Th. thiooxidans</i>		<i>Th. ferrooxidans</i>	
Stamm	verträgt g Cu/l	Stamm	verträgt g Cu/l
Bol 1	10,0	Beck	5,0
Bol 4	5,0	Bi 6	5,0
Fa 5	5,0	Bol 3	5,0
K _o	5,0	Scot	5,0
Scot	5,0	Fa 5	2,5
Starkey 3	5,0	Meg 5	2,5
Meg 5	2,5	K 2	0,5
K 5	0,05	Ram 2c	0,5
Starkey 2	0,025		
Starkey 1	0,005		

Bei Kupferkonzentrationen über 250 mg/l war in den gut entwickelten *Th. thiooxidans*-Kulturen nach etwa 24 Tagen ein schwarzer Belag auf der Schwefelblüte zu beobachten. Es handelte sich weder um eine Mischkultur mit Desulfurizierern (wiederholte Abimpfungen auf Desulfurizierer-Nährlösung nach STARKEY (1945) blieben negativ) noch mit *Pullularia* aus dem Biotop. Die mikroskopische Kontrolle ergab mineralische Bestandteile (Kupfersulfid). Wie auch STARKEY (1937) beobachtete, kann *Th. thiooxidans* geringe Mengen H₂S (mit Bleiacetat-Papier nachgewiesen) abgeben, die im sauren Milieu Cu⁺⁺ als Kupfersulfid ausfällen.

Für das Verhalten gegenüber Zinksulfat ergaben sich die gleichen Beziehungen wie bei Eisen- und Kupfersulfat. Die *ferrooxidans*-Stämme vertragen im allgemeinen höhere Zinkkonzentrationen als die *thiooxidans*-Stämme (Tab. 6 und 7). Letztere lassen sich aber leichter an höhere Zinksulfatgaben gewöhnen. Nach zehn Passagen (Tab. 8) werden z. T. 22%ige Zinksulfatlösungen vertragen¹⁾.

Tabelle 6
Zinktoleranz der *Th. thiooxidans*-Stämme

Versuchsdauer/40 Tage
Zeichenerklärung wie Tab. 1

Stamm	Zinkgehalt pro Liter der Nährlösung						
	5 mg	25 mg	50 mg	250 mg	500 mg	2,5 g	5 g
Bol 1	+++	+++	+++	+++	+++	++	+
Bol 4	+++	+++	++	+	—	—	—
Bol 5	+++	++	+	—	—	—	—
Elb 10	+++	++	+++	++	++	++	+
K _o	+++	+++	+++	+++	+++	++	+
Scot	+++	+++	+++	+++	++	+	—
Starkey 1	+++	+++	+++	++	+	—	—
Starkey 2	+++	+++	+++	+	—	—	—
Starkey 3	+++	+++	+++	++	+	—	—

¹⁾ Eine 22%ige Lösung von ZnSO₄ · 7 H₂O enthält 50 g Zn/l.

Tabelle 7
Zinktoleranz der *Th. ferrooxidans*-Stämme

Versuchsdauer 40 Tage

Zeichenerklärung wie Tab. 2

Stamm	Zinkgehalt pro Liter der Nährlösung						
	5 mg	25 mg	50 mg	250 mg	500 mg	2,5 g	5 g
Bi 6	+++	+++	+++	+++	+++	++	+
Beck	+++	+++	+++	+++	+++	++	—
Bol 3	+++	+++	+++	+++	+++	++	+
Elb 4	+++	+++	+++	++	++	++	+
Fa 5	+++	+++	+++	+++	+++	++	+
K 2	+++	+++	+++	++	+	—	—
Meg 5	+++	+++	+++	+++	+++	++	+
Ram 2 c	++	++	+	+	—	—	—
Scot	+++	+++	+++	++	+	—	—

Tabelle 8
Adaptation von *Th. thiooxidans* und *Th. ferrooxidans*
an höhere Zinkkonzentrationen

<i>Th. thiooxidans</i>		<i>Th. ferrooxidans</i>	
Stamm	verträgt g Zn/l	Stamm	verträgt g Zn/l
Bol 1	50,0	Beck	25,0
Elb 10	50,0	Bi 6	25,0
K _o	50,0	Bol 3	25,0
Starkey 3	50,0	Elb 4	25,0
Bol 4	25,0	Fa 5	25,0
Starkey 1	25,0	K 2	25,0
Bol 5	12,5	Meg 5	25,0
Scot	12,5	Scot	25,0
Starkey 2	12,5	Ram 2 c	0,25

Tabelle 9
Oxydation von Kupfersulfid zu Kupfersulfat durch *Thiobacillus thiooxidans*¹⁾

Zeit in Tg.	Stamm								Sterilkontrolle p _H	γ Cu/ml
	Bi 6		Bing		Bol					
	p _H	γ Cu/ml	p _H	γ Cu/ml	p _H	γ Cu/ml				
14	1,89	230	2,12	220	1,98	190	4,50	135		
50	1,26	1400	1,71	1100	1,60	1150	4,32	240		
100	0,91	1730	0,78	1550	0,63	2100	4,01	570		

Tabelle 10
Oxydation von Kupfersulfid zu Kupfersulfat durch *Thiobacillus ferrooxidans*¹⁾

Zeit in Tg.	Stamm								Sterilkontrolle p _H	Cu/ml
	Bi 6		Bing		Bol 3					
	p _H	Cu/ml	p _H	Cu/ml	p _H	Cu/ml				
14	2,92	240	3,02	245	2,97	230	3,90	180		
50	2,62	1730	2,59	1600	2,76	1700	3,65	450		
100	2,52	3260	2,47	2400	2,58	2320	3,52	600		

¹⁾ Die Kupferwerte sind Mittelwerte aus 5 Bestimmungen.

IV. Versuche zur Frage der mikrobiologischen Aufarbeitung von frisch gefälltem Kupfersulfid und von Kupfererzen

Wir haben zunächst bei je drei der *Th. thiooxidans*- und *ferrooxidans*-Stämme geprüft, ob Kupfer aus frisch gefälltem Kupfersulfid¹⁾ in Lösung gebracht werden kann.

Auf 100 ml STA/S bzw. LE-Lösung haben wir 500 mg Kupfersulfid (in Reagenzgläsern 3×30 min. sterilisiert und der Nährlösung aseptisch zugesetzt) gegeben, mit *thiooxidans* bzw. *ferrooxidans* beimpft und durch wiederholte p_{H} -Messungen die Säuerung des Mediums verfolgt. Nach 14, 50 und 100 Tagen wurden die Proben zur Kupferbestimmung entnommen. Die Oxydation des Kupfersulfids zu Kupfersulfat verläuft innerhalb von hundert Tagen in einigen Fällen nahezu quantitativ²⁾ (Tab. 9 und 10). Sie ist bei *ferrooxidans* intensiver als bei *thiooxidans*. *Th. ferrooxidans* arbeitet beim Lösungsvorgang des Kupfers aus Sulfid wie ein Katalysator, indem er das bei der Oxydation des Kupfers reduzierte Eisen wieder oxydiert. Das gleiche gilt für Kupferglanz, aber auch für Molybdän im Molybdänit und für einige andere Fälle (ZIMMERLY u. a. 1958).

BRYNER, BECK und Mitarbeiter haben sich besonders eingehend mit Fragen der mikrobiologischen Aufarbeitung sulfidischer Erze beschäftigt. Wir haben für unsere Modellversuche in Anlehnung an BRYNER u. JAMESON (1957) einfache Perkolatoren konstruiert (Abb. 1).

Als Behälter für das zu untersuchende kupferhaltige Material (400 g) diente ein 40 cm langes, 4 cm weites Glasrohr (*P*) mit einem perforierten Zwischenboden (*C*). Die bakterienhaltige Suspension wurde durch das Glasrohr (*A*) zugeführt. Luftzufuhr und Flüssigkeitsbewegung erfolgten über das Steigrohr (*F*). Die bei *E* eintretende Luft reißt in einer Luft/Flüssigkeitskette Tropfen der im unteren Teil von *E* und *F* stehenden Lösung mit in die Höhe. Zum Antrieb diente ein Druckluftgebläse, das täglich 3 bis 4 Stunden in Betrieb war. Bei *G* ist ein Verteilerrohr *B* angeschlossen, aus dem die Flüssigkeit auf das Untersuchungsmaterial tropft und lang-

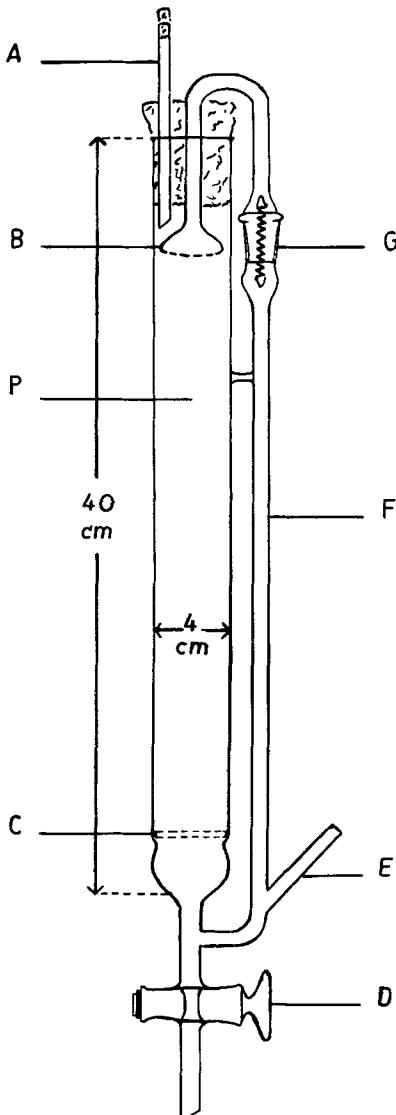


Abb. 1. Längsschnitt durch einen Perkolator (Zeichenerklärung im Text)

¹⁾ Kupfersulfid wurde durch Einleiten von H_2S in salzaure Kupfersulfatlösung gefällt, abfiltriert, wiederholt mit Auqa dest. gewaschen und bei 90°C getrocknet (JANDER u. WENDT, 1954).

²⁾ 500 mg CuS enthalten 334 mg Cu, das entspricht 3340 $\gamma\text{Cu}/\text{ml}$.

sam nach unten sickert. Über den Hahn *D* können Flüssigkeitsproben zur Untersuchung entnommen werden. *A*, *F* und *P* sind durch Wattefilter verschlossen.

Zur Füllung der Perkolatoren diente Kupferglanz (Chalkosin)¹⁾ im Gemisch mit Sand. Die gefüllten Perkolatoren wurden im Autoklaven 30 min. bei 1 atü. sterilisiert und anschließend mit je 50 ml einer zehn bis vierzehn Tage alten *Th. thiooxidans*- und *Th. ferrooxidans*-Kultur beschickt; sie waren in Gruppen von drei bis vier Stück an ein Gebläse angeschlossen (Abb. 2).

Wir haben wöchentlich je Gerät eine Probe von 20 ml für p_{H} -Messungen und Kupferanalysen entnommen und durch frische Kulturlösigkeit ersetzt.

Die Ergebnisse der Perkolator-Versuche mit Kupferglanz und karbonatfreiem Sand (Tab. 11) deckten sich im wesentlichen mit den Ergebnissen von BRYNER u. a. (1954). BRYNER verwendete als Sterilkontrolle LE-Lösung (p_{H} etwa 3,8). Wir benutzten hitzesterilisierte, filtrierte Bakterienkulturen, die also schon beträchtliche Fe^{III} -und Säuremengen enthielten (p_{H} -Wert im Durchschnitt bei 2,0). Die Unterschiede im

Kupfergehalt zwischen Sterilkontrolle und bakterienführenden Perkolatoren sind daher bei uns geringer als bei BRYNER. Die Wirkung des Sterifikates ist eine reine Säurewirkung. Es konnte jedoch gezeigt werden, daß der Auslaugungsvorgang nicht allein durch die Acidität der Flüssigkeit bedingt ist, sondern durch die Bakterientätigkeit beschleunigt wird, wie auch DAVIS (1953) angibt.

In weiteren Versuchen (Tab. 13) bei denen die Lüftung intensiver war, ergaben sich entsprechend höhere Kupferwerte. Im Prinzip waren die Ergebnisse die gleichen.

Abb. 2. Vier Perkolatoren-Batterien vor Inbetriebnahme

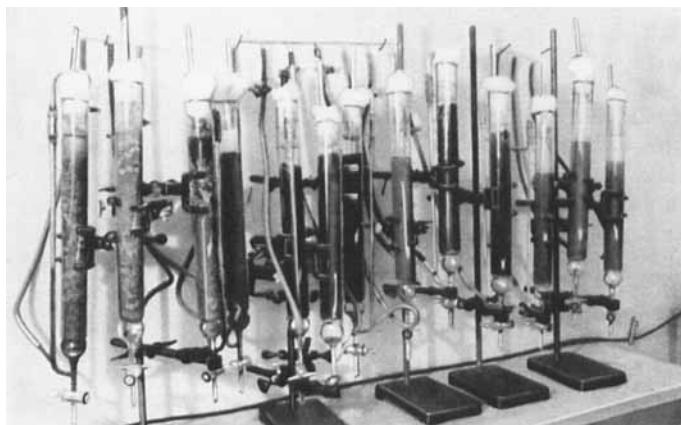


Tabelle 11

Verhalten von *Th. thiooxidans* und *Th. ferrooxidans* in Perkolatoren mit Kupferglanz (Beschickung je Gerät: 400 g karbonatfreier Sand + 20 g Kupferglanz, Korngröße 0,25 bis 0,6 mm)

Laufzeit in Tg.	Bi 6		Bi 6		Sterifikat Bi 6	
	p_{H}	$\gamma \text{ Cu/ml}$	p_{H}	$\gamma \text{ Cu/ml}$	p_{H}	$\gamma \text{ Cu/ml}$
7	2,01	27	2,02	25	1,98	20
14	—	37	—	37	—	25
21	1,92	77	1,98	78	1,97	62
28	—	96	—	93	—	78
35	1,96	220	1,97	230	1,98	150
42	—	450	—	475	—	270
49	1,92	930	1,95	1100	1,95	370
56	1,94	1070	1,92	1400	2,01	450

¹⁾ Fundort: Meggen/Westfalen

V. Beteiligung der beiden *Thiobacillus*-Arten an der Mobilisierung des Kupfers

Am natürlichen Standort, im sauren Grubenwasser, sind, wie früher gezeigt wurde (MARCHLEWITZ und SCHWARTZ, 1960/61), beide *Thiobacillus*-Arten im Gemisch vertreten. Da nach SILVERMAN und LUNDGREN (1959) *Th. ferrooxidans* auch Schwefel oxydiert, wäre denkbar, daß *ferrooxidans* allein den Oxydationsprozeß in gleicher Intensität durchführen kann, wie es bei einem Gemisch beider Arten der Fall ist. Zur Klärung dieser Frage haben wir das Verhalten von *Th. thiooxidans* (Stamm Bi 6) und *ferrooxidans* (Stamm Bi 6) einzeln und im Gemisch gegenüber Kupferglanz untersucht.

Als Kulturgefäße dienten 750 ml-Erlenmeyer-Kolben mit 350 ml Nährlösung (LE bzw. STA/S). Je Kolben wogen wir 100 mg Kupferglanz¹⁾ (Korngröße 0,09 bis 0,1 mm) ein, der vorher feucht sterilisiert und rückgetrocknet worden war. Geimpft wurde je Kolben mit 3,5 ml Bakteriensuspension aus jungen Kulturen. Während einer Versuchsdauer von zwei Monaten wurde alle acht Tage die Menge des in Lösung gegangenen Kupfers bestimmt.

In einem Gemisch der Kulturen beider Arten zeigte sich, daß *ferrooxidans* bei einem Mischungsverhältnis 1:1 der beiden Nährösungen durch das rasche Absinken der pH-Werte auf 1,7 bis 1,9 innerhalb von zehn Tagen unterdrückt wurde. Dies ist auf die Lebenstätigkeit von *thiooxidans* zurückzuführen. Im Gemisch von 250 ml LE und 100 ml STA/S oder 300 ml LE und 50 ml STA/S kamen beide Arten zur Entwicklung.

Aus den Versuchen geht hervor, daß in Reinkulturen von *Th. thiooxidans* nur etwa die Hälfte der Kupfermenge oder wenig mehr gelöst wird, die in *ferrooxidans*-Reinkulturen und in Mischkulturen auftritt (Tab. 12). (Vgl. dazu auch Abschnitt IV Tab. 9 und 10).

Tabelle 12

Verhalten von Reinkulturen und Gemischen gegenüber Kupferglanz
(Mittelwerte aus je 5 Versuchskolben)

Ansatz	pH-Werte ²⁾		$\gamma\text{Cu}/\text{ml}$ nach 8 Wochen
	bei Versuchs- beginn	nach 8 Wochen	
<i>Th. thiooxidans</i> in STA/S	V ³⁾ 4	1,2 1,4	55 78
<i>Th. ferrooxidans</i> in LE	V 2—3 3—4	2,6 2,7	113 122
Gemisch von <i>Th. thio.</i> und <i>Th. ferro.</i> in 300 ml LE + 50 ml STA/S	V 2—3	1,8	122
Gemisch von <i>Th. thio.</i> und <i>Th. ferro.</i> in 250 ml LE + 100 ml STA/S	V 3—4	1,9 1,4	113 120
		1,6	126

Zwischen *ferrooxidans*-Reinkulturen und Gemischen beider Arten waren die Unterschiede in Bezug auf den zeitlichen Verlauf und die Kupfer-Endwerte gering (Abb. 3). *Th. ferrooxidans* war also in der Lage, unter den gegebenen Bedingungen allein den Lösungsprozeß im gleichen Umfang wie im Gemisch durchzuführen. Aus den Ver-

¹⁾ Fundort: Tsumeb/SW-Afrika

²⁾ Bei Versuchsbeginn wurden die pH-Werte nur angenähert mit Indikator-Papier bestimmt; bei Abschluß der Versuche erfolgte die Bestimmung elektrometrisch.

³⁾ V bedeutet Vorkultur: Die Kolben wurden in den *thiooxidans*-Versuchen 10, in den *ferrooxidans*-Versuchen 6 Tage vor Zugabe des Kupferglanzes geimpft. Die pH-Werte wurden bei Zugabe des Kupferglanzes abgelesen.

suchen (Tab. 12) ging hervor, daß *Th. ferrooxidans* beim Lösungsvorgang des Kupfers wie ein Katalysator wirkt und daß man nicht allein die Säure für die Mobilisierung des Kupfers verantwortlich machen kann. Dies wird besonders deutlich, wenn man die Mengen des gelösten Kupfers in den *Th. thiooxidans*- und *Th. ferrooxidans*-Reinkulturen vergleicht.

VI. Einfluß der Durchlüftung auf die Mobilisierung des Kupfers

Beide *Thiobacillus*-Arten entwickeln sich im sauren Grubenwasser aerob und C-autotroph. Wir haben mit Hilfe von Perkolatoren untersucht, ob durch einfache Lüftung und durch erhöhte O₂- und CO₂-Versorgung die Entwicklung der Thiobakterien und indirekt der Lösungsvorgang des Kupfers verbessert wird.

Zur Füllung der Perkolatoren diente ein Gemisch von grobem Sand¹⁾ (Korngröße 1,0 bis 2,5 mm) und Kupferglanz²⁾ (Korngröße 0,25 bis 0,6 mm) im Verhältnis 20:1. Vor seiner Verwendung wurde der Sand durch eine HCl-Behandlung von Kalkanteilen befreit. Die Lüftung er-

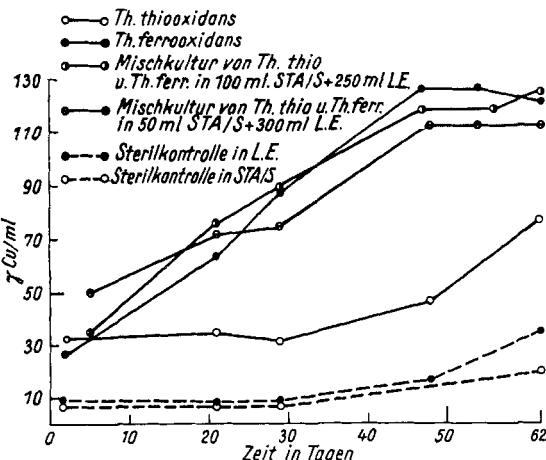


Abb. 3. Gelöste Kupfermengen in Reinkulturen und Mischkulturen

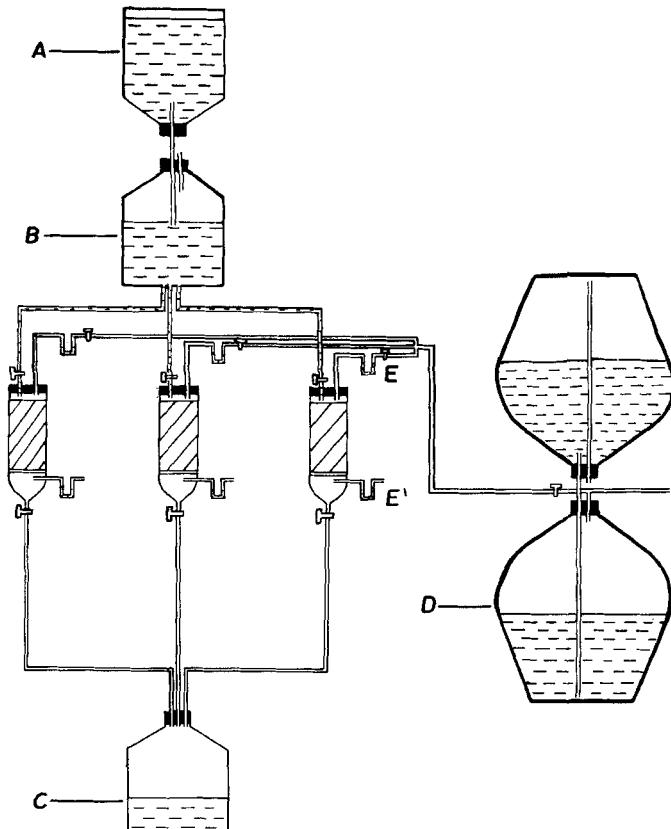


Abb. 4. Schema der Versuchsanordnung bei Zuführung eines Luftgemisches am unteren oder oberen Ende der Perkolatoren
 A Vorratsgefäß mit geimpfter Nährlösung
 B Überlaufgefäß zum Konstanthalten des Flüssigkeitsdruckes
 C Auffanggefäß für die abtropfende Flüssigkeit
 D Gasometer
 E und E' Luftzuführung unten bzw. oben am Perkolator

¹⁾ Gewöhnlicher Dünen-sand von der Ostseeküste bei Lubmin

²⁾ Fundart: Tsumeb/SW-Afrika

folgte teils mit Druckluft, teils mit Luftgemischen (20% O₂, 4% CO₂ u. 76% Luft) aus Gasometern. Als Zirkulationsflüssigkeit diente in Anpassung an die Verhältnisse am natürlichen Standort ein Gemisch von *Th. thiooxidans*- (Stamm Bi 6) und *Th. ferrooxidans*- (Stamm Bi 6) Kulturen im Verhältnis 1:1.

Die Lüftung wurde in verschiedener Weise variiert. Bei den Versuchen mit Luftgemischen trat die Luft entweder unten über ein seitlich eingeschmolzenes Rohr in die Perkolatoren ein, während die keimhaltige Flüssigkeit von oben auf die Füllung auftröpfte, oder beides, die keimhaltige Flüssigkeit und das Luftgemisch, wurden von oben zugeleitet (Abb. 4). Das tägliche Flüssigkeitsangebot in Gefäß A betrug 10 l. In Gefäß C wurde die abtropfende Lösung gesammelt und wieder zur Füllung des Gefäßes A benutzt. Bei Versuchen mit Druckluftgebläse wurde das Prinzip der Mammutpumpe verwendet (vgl. Abb. 1).

Vergleicht man das Ergebnis der bei ruhender Luft (vgl. Abschnitt IV) und mit Lüftung durchgeführten Versuche, so ist trotz der im einzelnen vorhandenen Unterschiede in der Versuchsanordnung¹⁾ der Einfluß der verbesserten O₂- und CO₂-Versorgung (zwischen beiden wurde nicht differenziert) deutlich zu erkennen. (Tab. 13).

Tabelle 13

Vergleichende Versuche über den Einfluß der Lüftung auf die Mobilisierung des Kupfer

Versuchsgruppe	Flüssigkeitsmenge	angenäherte Luftmenge	Kupferglanzmenge	nach 2 Monaten gelöst Kupfer durchschnittlich γ/ml
ruhende Luft (Kolben Abs. V)	350 ml	400 ml	100 mg	120
Luftgemisch von unten zugeführt (Perkolatoren Abb. 4)	20 l	50 l/Tag erhöhte O ₂ - u. CO ₂ -Gaben	60 g	170
Luftgemisch von oben zugeführt (Perkolatoren Abb. 4)	20 l	50 l/Tag erhöhte O ₂ - u. CO ₂ -Gaben	60 g	1000
Luft täglich 8—10 Std. zirkulierend (Perkolatoren Abb. 1)	2 l	ständig zirkulierend	20 g	2600

VII. Verhalten von Mansfelder Kupferschiefer im Leaching-Prozeß

Der Mansfelder Kupferschiefer, eine Ablagerung des Zechsteinmeeres, besteht in seiner chemisch-mineralogischen Zusammensetzung nach PETRASCHECK (1960) im Durchschnitt aus:

- 50 bis 55% Quarz und Serizit
- 25 bis 30% Kalk und Dolomit
- 10% Bitumen
- 10% Sulfiden

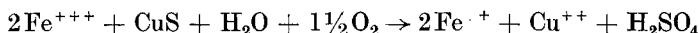
Der Kupfergehalt schwankt erheblich; in kupferreichen Partien des Flözes erreicht er 3,6%, in kupferarmen sinkt er beträchtlich. In der Hauptsache handelt es sich um Buntkupfererz (Bornit, Cu₃FeS₄), Kupferglanz (Cu₂S) und Kupferkies (Chalkopyrit, CuFeS₂). Daneben treten z. B. Pyrit, Zinkblende, Bleiglanz und gediegenes Silber auf (PETRASCHECK, 1950; SCHNEIDERHÖHN 1955).

¹⁾ Die Durchführung der Kontrollversuche in stagnierender Luft erschien uns in Kolben zweckmäßiger als in Perkolatoren.

Zur Füllung der Perkolatoren (vgl. Abb. 1 und 2) dienten je 400 g Kupferschiefer¹⁾. Die Korngröße betrug 1 bis 5 mm, um einer Verschlammung der Perkolatoren vorzubeugen. Der hohe Kalkgehalt störte, wie zu erwarten war, die Entwicklung der Kulturen. Die im Oxydationsprozeß entstehende Säure wurde als Calciumsulfat gebunden. Die Menge des in Lösung gehenden Kupfers blieb daher gering. Nach einer Versuchsdauer von 126 Tagen enthielt die im Perkolator zirkulierende Flüssigkeit nur 2 γ Cu/ml. Während dieser Zeit schwankten im Gegensatz zu den sonstigen Versuchsabläufen die p_{H} -Werte zwischen 4,5 und 7. Mit steigenden p_{H} -Werten muß daran gedacht werden, daß in Lösung gegangenes Kupfer bereits als Kupferhydroxyd ausfällt und adsorptiv an das Gestein gebunden werden kann.

Da auch der Kalkgehalt des Kupferschiefers schwankt, finden sich kalkarme Partien im Flöz. Wir haben für die folgenden Versuche kalkarmen Kupferschiefer benutzt, dessen Verhüttung nicht lohnt.²⁾

Aus Versuchen von BRYNER und ANDERSON (1957) geht hervor, daß als Fe^{III}-Sulfat in Lösung gehendes Eisen günstig auf die Oxydation des Kupfers wirkt:



Um auch in dieser Beziehung die Bedingungen günstig zu gestalten, haben wir dem Kupferschiefer Pyrit im folgenden Verhältnis zugesetzt:

je Perkolator	Gruppe A	Gruppe B
Kupferschiefer	180 g	140 g
Pyrit	20 g	60 g
Sand	100 g	100 g

Täglich wurde in der früher beschriebenen Versuchsanordnung (vgl. S. 184) während 7 bis 9 Stunden Druckluft im langsamen Strom eingeleitet. Als Zirkulationsflüssigkeit diente wieder ein Gemisch von *Th. thiooxidans*- (Stamm Bi 6) und *Th. ferrooxidans*- (Stamm Bi 6) Kulturen im Verhältnis 1:1.

Bei einer Versuchsdauer von 80 Tagen gingen etwa 1700 γ Cu/ml in Lösung (Abb. 5). Die Endwerte waren in beiden Versuchsgruppen annähernd gleich. Der Lösungsvor-

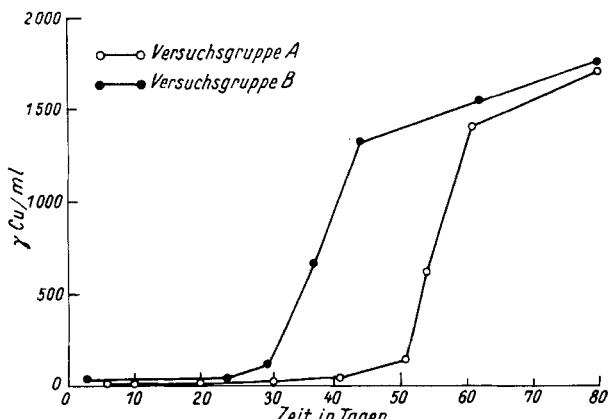


Abb. 5. Kupferausbeute in Gemischen von Kupferschiefer und Pyrit

¹⁾ Kupferschiefer aus dem Thomas-Münzter-Schacht in Sangerhausen

²⁾ Aus dem Kupferschieferbergbau Niederröblingen/Helme

gang wurde durch die höheren Pyrit-Zusätze in den Geräten der Gruppe B anfangs beschleunigt. Es ist zu erwarten, daß bei längerer Versuchsdauer auch die in Lösung gehende Kupfermenge höher sein wird als in Versuchsgruppe A.

VIII. Diskussion

Schwermetalltoleranz und Säuretoleranz sind die standortbestimmenden Merkmale der Mikroben saurer Grubenwässer. Die Leitororganismen, *Thiobacillus thiooxidans* und *Th. ferrooxidans* tragen durch die Art ihres Stoffwechsels aktiv zur Ausbildung der Standortsbedingungen bei, indem sie die Oxydation der Sulfidionen katalysieren und gleichzeitig die Schwermetallionen, in erster Linie Fe und Cu, in die lösliche Form überführen. Die in wechselnder Menge vorhandenen Artengemische von Ascomyeeten und Fungi imperfecti, darunter auch asporogene Hefen (Cryptococcaceae), besitzen lediglich hohe Toleranzen, ohne aktiv in den Prozeß einzugreifen (MARCHLEWITZ u. SCHWARTZ, 1960/61).

Auf den von den Thiobakterien bewirkten Umsetzungen beruht das „Leaching-Verfahren“ zur Gewinnung von Kupfer aus minderwertigen sulfidischen Erzen und Abraum, wie es bereits an verschiedenen Stellen (Bisbee, Cananea usw.) durchgeführt wird. Da es sich um aerobe Prozesse bei C-autotrophen Bakterien handelt, ist es verständlich, daß im Modellversuch der Ablauf der biochemischen und chemischen Vorgänge durch Lüftung des zu oxydierenden Materials wesentlich beschleunigt werden kann. Bei der Durchführung in großem Maßstab muß diesem Umstand Rechnung getragen werden. Auch eine Verbesserung der Stickstoff-Versorgung durch Zugabe kleinerer Mengen einer anorganischen N-Verbindung (z. B. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) zum Leaching-Wasser wird empfehlenswert sein.

Am natürlichen Standort treten beide *Thiobacillus*-Arten meist gemeinsam auf, im Modellversuch liefert jedoch *Th. ferrooxidans* dieselben Kupferausbeuten wie das Gemisch beider Arten, so daß für praktische Zwecke wahrscheinlich eine Impfung mit ausgesuchten Stämmen von *ferrooxidans* ausreichen wird.

Ein Faktor von entscheidender Bedeutung ist der Gehalt an Kalkspat in der Gangart bzw. im erzführenden Gestein. Kalkarmes Material bereitet kaum Schwierigkeiten. Andersartig verhält sich dagegen der im mitteldeutschen Raum vorkommende Mansfelder Kupferschiefer. Er enthält größere Mengen von Kalkspat zusammen mit Dolomit bis etwa 30% (vgl. S. 188), durch den im Leaching-Prozeß die entstehende H_2SO_4 ständig als CaSO_4 gefällt wird. Da das Wachstumsoptimum der beiden *Thiobacillus*-Arten unter p_{H} 4 liegt, werden Entwicklung und Schwermetalloxydation erheblich verzögert, unter Umständen sogar blockiert. Es kommt hinzu, daß bereits in Lösung gegangenes Kupfer oberhalb p_{H} 5,3 als $\text{Cu}(\text{OH})_2$ gefällt und adsorbiert werden kann. Im Modellversuch verstopft der CaSO_4 -Schlamm allmählich die Poren und verhindert die Zirkulation von Luft und Flüssigkeit. Kalkarme Partien des Kupferschiefers lassen sich dagegen aufarbeiten, wenn man Pyrit zur Verbesserung der Säurebildung zusetzt.

Der Kalkgehalt des Kupferschiefers dürfte mit der Geschichte seiner Entstehung aus einem Sapropel zusammenhängen, dessen H_2S -Gehalt zur Hauptsache aus der Desulfurikation von Gips (oder Anhydrit) stammt. Hierbei entsteht CaCO_3 , das wie in Erdoellagerstätten und rezenten Sapropelen, in kristalliner Form auftritt.

Zusammenfassung

1. Stämme von *Thiobacillus thiooxidans* und *Th. ferrooxidans* sind meist durch hohe Toleranz gegenüber Schwermetallen (Fe, Cu, Zn) ausgezeichnet, die sich durch Adaptation steigern läßt.
2. Zwischen der Höhe der maximal tolerierten Schwermetallmengen und der Herkunft der Stämme lassen sich Beziehungen nachweisen.

3. In Modellversuchen mit Kupferglanz gehen in Bestätigung der Versuche von BRYNER u. a. bei Gegenwart der beiden *Thiobacillus*-Arten erheblich höhere Kupfermengen in Lösung als in sterilen Kontrollversuchen.

4. Ist nur *Th. thiooxidans* vorhanden, so sind die in Lösung gehenden Kupfermengen wesentlich geringer. Reinkulturen von *Th. ferrooxidans* haben annähernd die gleiche Wirksamkeit wie ein Gemisch beider Arten. Den Hauptanteil an der Oxydation sulfidischer Erze hat demnach *Th. ferrooxidans*.

5. Lüftung und zusätzliche O₂- und CO₂-Versorgung erhöhen wesentlich die Ausbeute an gelöstem Kupfer.

6. Da *Th. ferrooxidans* seinen Energiebedarf aus der Oxydation von Fe^{II} zu Fe^{III} deckt, ist die Oxydation sulfidischer Kupfererze an die Anwesenheit von Eisensulfiden (Pyrit, Markasit) oder anderen Ferroverbindungen gebunden.

7. Aus kalkarmen Partien des Mansfelder Kupferschiefers kann durch den Leaching-Prozeß Kupfer in Lösung gebracht werden, wenn Pyrit in ausreichender Menge vorhanden ist oder zugesetzt wird.

Literatur

- [1] BRYNER, L. C., BECK, J. V., DAVIS, D. B. u. WILSON, D. G., 1954. Microorganisms in leaching sulfide minerals. Ind. Eng. Chem. **46**, 2587—2592.
- [2] BRYNER, L. C., u. ANDERSON, R., 1957. Microorganisms in leaching sulfide minerals. Ind. Eng. Chem. **49**, 1721—1724.
- [3] BRYNER, L. C. u. JAMESON, A. K., 1958. Mikroorganismen in leaching sulfide minerals. Appl. Microbiol. **6**, 4, 281—287.
- [4] CALLAN, T. u. HENDERSON, R., 1929. A new reagent for the colorimetric determination of minute amounts of copper. Analyst **54**, 650—653.
- [5] DAVIS, D. B., 1953. Biological oxidation of copper sulfide minerals. Masters thesis, Birmingham Young University.
- [6] JANDER, G. u. WENDT, H. 1954. Einführung in das anorganisch-chemische Praktikum. Leipzig: S. Hirzel Verlag.
- [7] LEATHEN, W. W., BRALEY, S. A. u. MCINTYRE, L. D., 1953. The role of bacteria in the formation of acid from certain sulfuric constituents associated with bituminous coal. I. *Thiobacillus thiooxidans*. Appl. Microbiol. **1**, 2, 61—64.
- [8] LEATHEN, W. W., BRALEY, S. A. u. MCINTYRE, L. D., 1953. The role of bacteria in the formation of acid from certain sulfuric constituents associated with bituminous coal. II. Ferrous iron oxidizing bacteria. Appl. Microbiol. **1**, 2, 65—68.
- [9] MARCHLEWITZ, B. u. SCHWARTZ, W. 1960/61. Untersuchungen über die Mikrobenassoziation saurer Grubenwässer. Zeitschr. f. Allg. Mikrobiol. **1**, 100—114.
- [10] McFARLANE, W. D., 1932. Applikation of the sodium diethyldithiocarbamate reaction to the microcolorimetric determination of copper in organic substances. Biochem. J. **26**, 1022—1033.
- [11] PETRASCHECK, W. u. PETRASCHECK, W. E., 1950. Lagerstättenkunde. Wien: Springer-Verlag.
- [12] SCHNEIDERHÖHN, H. 1955. Erzlagerstätten. Stuttgart: Gustav Fischer Verlag.
- [13] SILVERMAN, M. P. u. LUNDGREN, D. G., 1959. Studies on the chemoautotrophic iron bacterium *Ferrobacillus ferrooxidans*. II. Manometric studies. J. Bact. **78**, 3, 326—331.
- [14] STARKEY, R. L. 1937. Formation of sulfide by some bacteria. J. Bact. **33**, 545—571.
- [15] STARKEY, R. L. u. WIGHT, K. M., 1945. Anaerobic corrosion of iron in soil. New York: American Gas Association.
- [16] TEMPLE, K. L. u. KOEHLER, W. A., 1954. Drainage from bituminous coal mines. West Virginia University Bull. Series **54**, 4, 1—35.
- [17] THUN, R., HERMAN, R. u. KNICKMANN, E., 1955. Die Untersuchung von Böden. Methodenbuch Bd. 1, Radebeul u. Berlin: Neumann Verlag.
- [18] WEED, R. C., 1956. Cananeas program for leaching in place. Mining. Eng. **8**, 721—723.
- [19] WILSON, D. G., 1952. Studies on the biological oxidation of iron pyrites. Masters thesis, Birmingham Young University.
- [20] ZIMMERLY, S. R., WILSON, D. G. u. PRATER, J. P., 1958. How bacteria leach low-grade ores. Eng. and Mining J. **159**, 6 89—91.