

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE MIKROBENASSOZIATION
=====

SAURER GRUBENWÄSSER.
=====

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

zur

Erlangung der Doktorwürde

einer

Hohen Mathematisch - Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Ernst-Moritz-Arndt Universität zu Greifswald

vorgelegt

von

Brunhilde Marchlewitz

geb. Bachmann

Nanslau

- 1959 -

Dekan: Professor Dr. W. Schallreuter

Referent: Professor Dr. W. Schwartz

Korreferent: Professor Dr. O. Zedlitz

Tag der mündlichen Prüfung: 12. 12. 1959

Inhaltsverzeichnis

	<u>Seite</u>
I. Einleitung	1
II. Material und Methoden	4
III. Gewinnung von Reinkulturen	9
IV. Vergleichende Untersuchungen an Thio- bacillus thiooxidans und Th. ferrooxidans	
1. Thiobacillus thiooxidans	12
2. Thiobacillus ferrooxidans	17
3. Bemerkungen zur Taxonomie der Gattung Thiobacillus	22
V. Die Pilzflora der sauren Grubenwässer ..	25
VI. Einfluß der Pilze auf die Entwicklung der Thiobakterien und die Säurebildung	27
VII. Verhalten der Thiobakterien gegenüber Eisen-, Kupfer- und Zinksulfat	34
VIII. Versuche zur Frage der mikrobiologischen Aufarbeitung von Kupfererzen	40
IX. Diskussion	48
X. Zusammenfassung	51
Literaturverzeichnis	53

I. Einleitung.

In der Oxydationszone sulfidischer Erzlagerstätten erfolgt ein ständiger Zerfall der Sulfide in sauerstoffreiche Verbindungen. So beobachtet man in feuchten Pyritlagerstätten auf Grund rein atmosphärischer Oxydation die Bildung von Eisensulfat und Schwefelsäure (SMIRNOW, 1954)



Ähnliche Erscheinungen konnten auch in Kohlengruben festgestellt werden. Die Abwässer der betreffenden Gruben weisen meistens eine recht beachtliche Azidität auf; pH-Werte von 1,5 bis 3 sind keine Seltenheit. Infolge dieses hohen Säuregrades treten Korrosionserscheinungen an Gleisanlagen, Rohren und Pumpen auf (TEMPLE u. KOEHLER, 1954).

An verschiedenen Stellen, in Cananea/Mexiko und in Bisbee/Arizona, benutzt man die stark sauren Grubenwässer für den sogenannten "leaching process" (WEED, 1956). Bei diesem Vorgang werden Kupfererze, deren Schwermetallgehalt so gering ist, daß eine Verhüttung nicht lohnt, mit Grubenwasser behandelt; dabei geht Kupfer in Anwesenheit von dreiwertigem Eisen in eine höhere Oxydationsstufe über und wird schließlich auf elektrolytischem Wege gewonnen.

Bis vor wenigen Jahren glaubte man, daß die Bildung saurer Grubenwässer rein chemisch bedingt sei. Es konnte jedoch festgestellt werden, daß zwei Mikroben aus der Gruppe der Thiobakterien den Prozeß wesentlich beschleunigen (COLMER, TEMPLE u. HINKLEY, 1950; LEATHEN u. MADISON, 1949).

Es handelt sich um *Thiobacillus thiooxydans*, WAKSMAN u. JOFFE, 1922 und um *Thiobacillus ferrooxydans*, TEMPLE u. COLMER, 1951. Beide Organismen waren stets bei bakteriologischen Untersuchungen der sauren Grubenwässer anzutreffen (ASHMEAD, 1955; FJERDINGSTAD, 1956; LEATHEN u. MADISON, 1949; TEMPLE u. COLMER, 1951). Andere Bakterien waren in dem stark sauren Milieu nicht nachweisbar. Unklar ist jedoch die Bedeutung der Pilze, die regelmäßig am Aufbau der Biocoenose beteiligt sind (ASHMEAD, 1956; COLMER und HINKLE, 1947). Diese Pilzwatten werden in der angelsächsischen Literatur als "streamers" bezeichnet (TEMPLE u. KOEHLER, 1954).

Da uns eine große Anzahl von Proben zur Verfügung stand, hatten wir die Möglichkeit, die Art- und Gattungsdiagnosen der Thiobakterien zu überprüfen und die Frage der Schwermetalltoleranz auf breiterer Basis zu untersuchen, als es bisher geschehen ist. Man darf erwarten, daß die Ergebnisse auch zur Klärung von Fragen der Genese und Topographie sedimentärer Lagerstätten beitragen.

Die Arbeit wurde im September 1956 auf Anregung von Herrn Professor Dr. Schwartz begonnen und unter seiner Leitung im Institut für Mikrobiologie der Ernst-Moritz-Arndt-Universität in Greifswald durchgeführt. Meinem verehrten Lehrer bin ich sehr dankbar für das rege Interesse, das er meiner Arbeit entgegenbrachte, für wertvolle Hinweise und die stete Förderung, die ich durch ihn erfuhr. Außerdem danke ich Herrn Professor Dr. Schwartz und Frau Dr. Schwartz für alle Mühen bei der Beschaffung des umfangreichen Untersuchungsmaterials.

II. Material und Methoden

Die Proben der oxydierten sulfidischen Erze, Braunkohlen und Grubenwässer (Tab. 1) wurden in den Gruben soweit als möglich unter aseptischen Bedingungen entnommen. Es erfolgte bei der Entnahme der Grubenwässer zunächst mittels Universal-Indical-Papier J 100 (Berlin-Chemie, Berlin-Adlershof) eine Prüfung des Säuregrades. Nur Wässer, deren pH-Wert unter 3,5 bis 4 lag, wurden gesammelt.

Es war bemerkenswert, daß gelegentlich bei einigen nicht weit voneinander entfernten Wasserlächen bzw. Tropfstellen recht unterschiedliche pH-Werte gefunden wurden. Trotz gleicher geologischer Bedingungen fanden wir z. B. in der Grube Einheit/Elbingerode auf der 170 m-Sohle/Süd-strecke eine Tropfstelle mit einem pH-Wert von 2 und in etwa 10 m Entfernung eine zweite Tropfstelle mit einem pH-Wert von 3,4. Die erstgenannte Probe enthielt nahezu 2×10^4 Thiobakterien pro ml, während im zweiten Fall diese Mikroben fehlten.

Tab. 1: Art und Herkunft der untersuchten Proben.

Herkunft	Standort	Probenbezeichnung ⁺
Bingham Canyon/Utah	sulfid. Erzlagerst.	Bing
Bisbee/Arizona	" "	Bi1, Bi2, Bi4, Bi6, Bi7
Bolliden/Schweden	" "	Bo11, Bo13, Bo14, Bo15
Elbingerode/Harz	" "	Elb 1 bis 14
Emmerstedt	Braunkohlentagebau	Em
Falun/Schweden	sulfid. Erzlagerst.	Fa4, Fa5
Freiberg/Sachsen	" "	Freib 1, Freib 3, Freib 4
Grünwalde/Lauchh.	Braunkohlentagebau	G 1 bis G 4
Helmstedt	" "	H 4, H 6
Kristineberg/Schwed.	sulfid. Erzlagerst.	K ₀ , K1, K2, K4, K5
Meggen/Westfalen	" "	Meg 4, Meg 5
Mexiko	" "	M
Rammelsberg/Goslar	" "	Ram 2b, Ram 2c
Rybinsk b. Borok/S.U.	Wassergraben am Stausee	Ryb 3 bis 6
Schottland	Kohlengrube	Scot
Schwandorf/Oberpfalz	Humboldtlin (Eisen-Oxalat)	Schwa

Herr Prof. Starkey/New Brunswick war so freundlich, uns drei Kulturen von *Th. thiooxidans* zu überlassen; außerdem stellte Herr Dr. Beck/Provo, Utah eine *Th. ferrooxidans*-Reinkultur und eine Wasserprobe aus Bingham zur Verfügung.

⁺) Die arabischen Zahlen und kleinen Buchstaben hinter den Abkürzungen dienen der genaueren Standortbezeichnung.

Für die Kultur der Thiobakterien sind etwa dreißig verschiedene Nährböden bekannt geworden. Davon haben wir zehn auf ihre Verwendungsmöglichkeit geprüft. Wir benutzten die Nährlösung nach STANKEY (1925), die im folgenden als STA/S bezeichnet wird. Die Zusammensetzung lautet:

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0,2 - 0,4 g	
KH_2PO_4	3,0 - 4,0 g	
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,25	g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,5	g
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,01	g
Aqua dest.	1000	ml
Schwefelblüte	10	g
pH-Wert	4,5	

Die Nährlösung ohne Schwefel wurde im Autoklaven 30 min bei 1 Atü. sterilisiert. Wir haben Schwefel in entsprechenden Mengen in Reagenzgläsern 3 mal 30 min im Dampftopf sterilisiert und nach Rücktrocknung (bei 60 bis 80°C) der Nährlösung aseptisch in möglichst feiner Verteilung zugesetzt.

Thiobacillus ferrooxidans wurde stets in dem von LEATHEN u. a. (1951) angegebenen Medium LB kultiviert:

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0,15 g
KCl	0,05 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,50 g
K_2HPO_4	0,05 g
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	0,01 g
Aqua dest.	1000 ml

Sterilisation erfolgte 30 min bei 1 Atü. im Autoklaven. Je 1 ml keimfrei filtrierte 10%ige $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ -

Lösung wurde nach dem Erkalten auf 100 ml LE-Lösung aseptisch zugefügt. Dieses Medium zeigte ein weißes Präzipitat, das aber bei der Kultur nicht störte. Der pH-Wert dieser Lösung liegt zwischen 3,5 und 4.

Zur Kultur der Pilze haben wir in den meisten Fällen Malz-Agar bzw. Czapek-Agar verwendet.

Soweit nicht anders angegeben, wurden alle Organismen bei 25° C kultiviert.

Als Kulturgefäße für Thiobakterien dienten in der Regel 100 ml-Erlenmeyer-Kolben aus Jenaer Geräteglas, die jeweils 50 ml Nährlösung enthielten. Sollten tägliche pH-Messungen über längere Zeit durchgeführt werden (siehe z. B. Kap. VI.), verwendeten wir 750 ml-Erlenmeyer-Kolben mit je 350 ml Nährlösung.

Alle Messungen der pH-Werte wurden mit einer mittelohmigen Mikro-Glaselektrode Typ GA 60 des Forschungsinstitutes Meinsberg/Sachsen in Verbindung mit dem pH-Meßverstärker MV 11 der Firma Küstner/Dresden ausgeführt.

Nephelometrische Messungen erfolgten mit dem Pulfrich-Photometer unter Verwendung des Spezialaufsatzes für Trübungs- und Fluoreszenzmessungen.

Die Kupferbestimmungen haben wir mit Natriumdithyldithiocarbamat in ammoniakalischer Lösung vorgenommen (CALLAN, T. u. HENDERSON, R., 1929; MC FARLANE, W. D., 1932; THUN u. a., 1955). Die Absorptionsintensität des braunen Farbkomplexes wurde im Pulfrich-Photometer unter Verwendung des Filters S 66 gemessen.

Einige Kupferbestimmungen (vergl. Kap. VIII) konnten parallel zu unseren Untersuchungen im Institut für Anorganische Chemie der Universität Greifswald nach folgenden Methoden ausgeführt werden: Kupfermengen bis zu 0,5 wurden mit Dithizon (Diphenylthiocarbazon) nach der Mischfarbennethode bzw. im Pulfrich-Photometer unter Verwendung des Filters S 61 bestimmt (SCHARRER u. KÜHN, 1940). Lösungen mit höherem Kupfergehalt wurden mit Neocuproin (2,9-Dimethyl-1,10-phenanthrolin), nach vorheriger Reduktion mit Hydroxylaminsulfat, versetzt, mit Isoamylalkohol ausgeschüttelt und unter Verwendung des Filters S 47 im Pulfrich-Photometer bestimmt (SMITH u. MC CURDY, 1952).

III. Gewinnung von Reinkulturen.

Als Ausgangsmaterial dienten meist die in den Gruben aseptisch entnommenen Wasserproben. Etwa 0,2 ml wurden in die Nährlösungen STA/S bzw. LB geimpft. Nach zehn bis vierzehn Tagen war in den meisten Fällen eine Entwicklung der Thiobakterien nachweisbar. Sie äußerte sich folgendermaßen: *Th. thiooxidans* trübt die Nährlösung stark und bildet Schwefelsäure, d.h. der pH-Wert fällt auf etwa 1 bis 2. *Th. ferrooxidans* oxydiert FeSO_4 zum rostbraunen $\text{Fe}(\text{OH})_3$, das besonders um die als Aufwuchs am Glas gebildeten Kolonien abgesetzt wird (Abb. 1). Die Säuerung erfolgt hier nur bis zu einem pH-Wert von etwa 2,5.



Abb. 1: Kolonien von *Th. ferrooxidans*, Stamm Meg 5 als Aufwuchs an der Wand eines Erlenmeyer-Kolbens.

In einigen Fällen erhält man auf diese Weise Thiobakterien-Reinkulturen. Als ständiger Begleiter treten in den meisten Kulturen Pilze auf, die auch bei einer raschen Folge von Subkulturen, wie es LIPMAN u.a. (1921)

empfehlen, nur schwer zu entfernen sind. Eine Verunreinigung der Kulturen mit heterotrophen Bakterien ist dagegen bei einem pH unter 5 nicht zu befürchten. Zur Kontrolle haben wir Fleischbouillon mit H_2SO_4 auf pH 2; 3; 4; 5; 6 und 7 eingestellt, mit Grubenwasser beimpft und nach vier bis sechs Wochen mikroskopisch untersucht. In den Kulturen unter pH 5 entwickelten sich häufig Pilze, während bei pH 5 bis 7 neben den Pilzen in vereinzelten Fällen auch Stäbchen wuchsen.

Zur Isolierung von *Th. thiooxidans* mittels des Koch'schen Plattengußverfahrens eignete sich die oben zitierte Nährlösung nach STARKEY mit einem Zusatz von 3% Agar und 0,5% Natriumthiosulfat anstelle von Schwefel.

Schwieriger war die Gewinnung von *Th. ferrooxidans*-Reinkulturen, da dieser Organismus auf Agarsubstraten nicht wächst.^{+) Es mußte auf dem Wege der Flüssigkeitskultur die Isolierung versucht werden. In einigen Fällen haben wir unter Anwendung des Titerverfahrens Reinkulturen gewonnen. Günstig erwies sich eine zehntägige Vorkultur auf der Schüttelmaschine, da durch die ständige Flüssigkeitsbewegung die Konidienbildung der Pilze unterdrückt wird. In der Biocoenose vorhandene Hefepilze ließen sich}

^{+) Die Herstellung des Silicagels mittels Ionenaustauscher (LEATHEN, 1955 u. 1956) war nicht möglich, da Amberlit IR-120 nicht in ausreichender Menge zur Verfügung stand und ein geeignetes Metasilikat fehlte. Wir haben mit dem Ionenaustauscher KPS 200 p.a. der Farbenfabrik Wolfen bei Bitterfeld und einem Natriummetasilikat der Firma Dr. Th. Schuchardt/München gearbeitet. Die Austauschersäule lieferte die gewünschte Kieselsäure (pH-Wert etwa 2) aber diese ergab kurz nach der Herstellung ein Gel, ohne daß eine Sterilisation und Mischung mit den gewünschten Salzen möglich war, wie es nach der Vorschrift von LEATHEN erforderlich ist.}

auf diese Weise nicht abtrennen. In der Annahme, daß ferrooxidans und die betreffenden Hefen eine verschiedene Anfälligkeit gegenüber Schwefelsäure aufweisen, haben wir Kolonien der Mischkulturen mit Schwefelsäure verschiedener Konzentration behandelt. Jedoch ließen sich die Hefen durch Schwefelsäurelösungen bis zu 5% nicht abtöten und bei 6; 8 und 10% H_2SO_4 waren die ferrooxidans-Zellen auch nicht mehr entwicklungsfähig. So konnten von den Proben Freib 1, G 1 bis G 4, M und Ryb 3 bis 6 bisher keine ferrooxidans-Reinkulturen gewonnen werden.

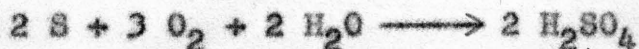
Von der Einzelkultur-Methode wurde abgesehen, da schon von anderer Seite festgestellt worden war, daß zum Anwachsen von Thiobakterienkulturen stets größere Zellenzahlen notwendig sind. Aus diesem Grunde impften wir auch nicht mit Ösen, sondern stets mit Pipetten 0,4 bis 0,5 ml auf je 50 ml Nährlösung. Beim Übertragen einer Öse der alten Kultur dauerte die Latenzphase zu lange.

Die Reinkultur der Pilze über das Koch'sche Platten-
gußverfahren bereitete keine Schwierigkeiten. Hefen bestimmten wir nach LODDER u. KREGER-VAN-RIJ (1952), Fungi imperfecti nach GILMAN (1957) und BARNETT (1954), Penicillien nach RAPER u. THOM (1949) und Aspergilli nach THOM u. RAPER (1945).

IV. Vergleichende Untersuchungen an *Th. thiooxidans* und *Th. ferrooxidans*.

1. *Thiobacillus thiooxidans*.

Es standen 12 Stämme verschiedener Herkunft zur Verfügung. Dieser Organismus ist in der Lage, Schwefel und Thiosulfat zu Schwefelsäure zu oxydieren (STARKEY, 1925);



gleichzeitig sinkt der pH-Wert in den Kulturen z.T. bis auf Werte unter 1 (Abb. 2) und die Kulturlösung trübt sich. Trübungsgrad und Abfall der pH-Werte verhalten sich annähernd umgekehrt proportional (Abb. 3). Die Intensität der Säuerung ist bei den einzelnen Stämmen verschieden stark (Abb. 4).

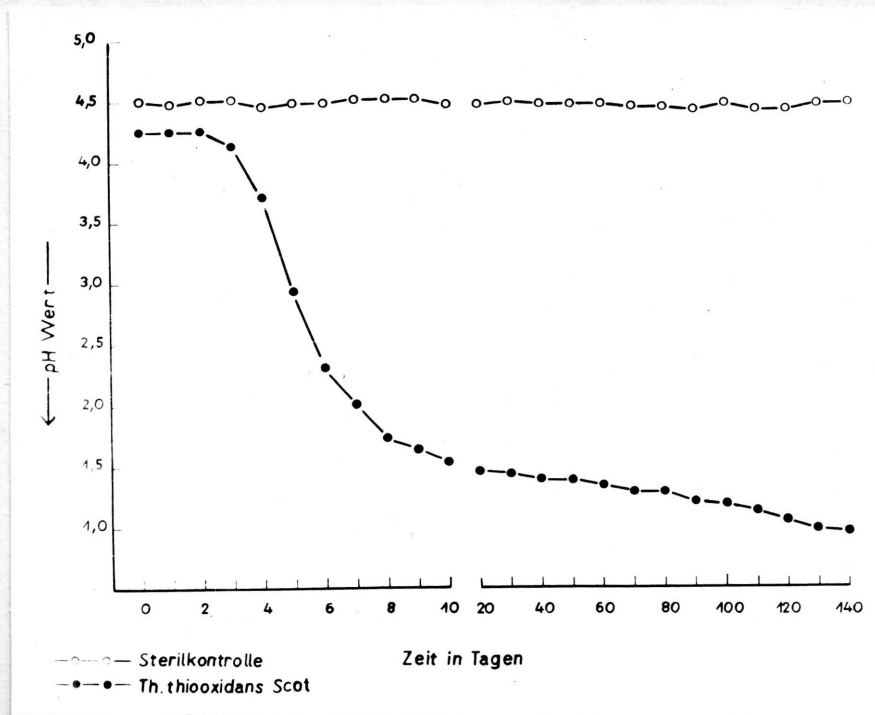


Abb. 2; Säuerung des Mediums durch *Th. thiooxidans*, Stamm Scot.

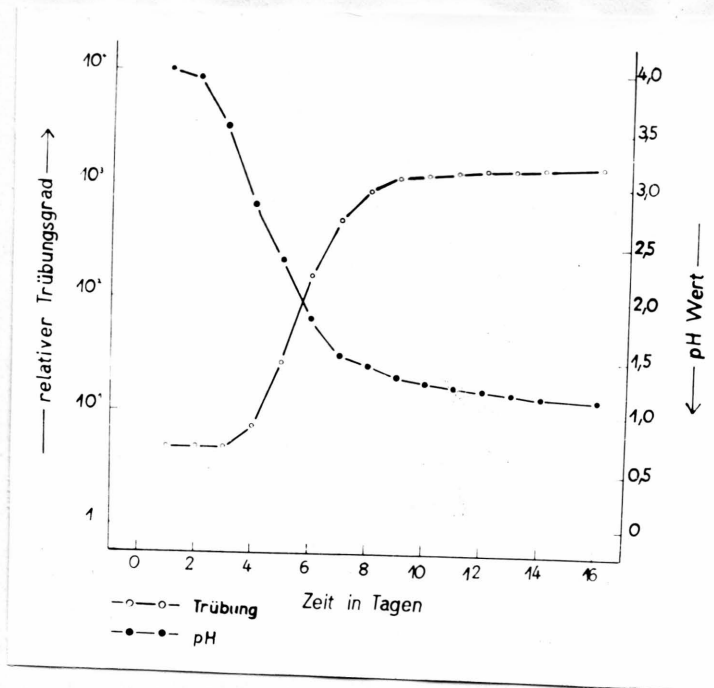


Abb. 3: Vergleichende Darstellung der Säureproduktion und des Trübungsgrades bei *Th. thiooxidans*, Stamm Starkey 2.

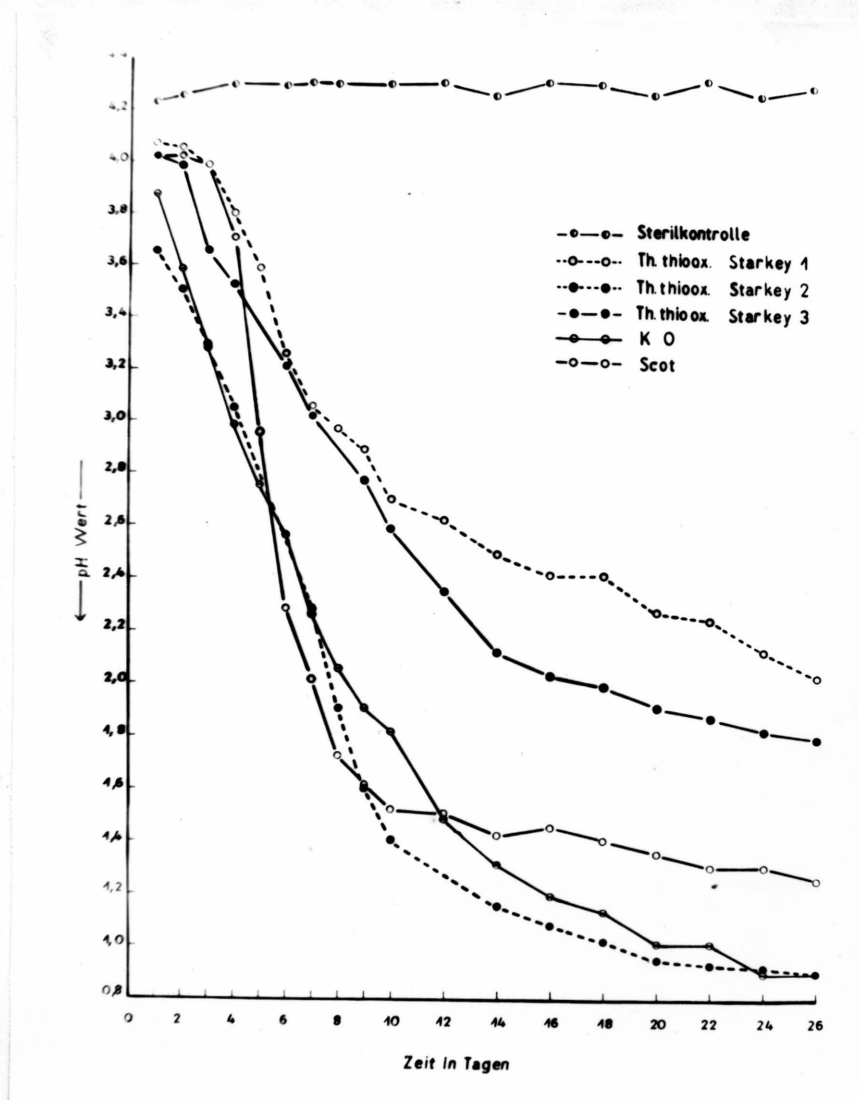


Abb. 4: Vergleichende Darstellung der Säureproduktion bei fünf verschiedenen *Th. thiooxidans*-Stämmen.

QUISPEL u.a. (1953) nehmen an, daß die Oxydation von Schwefel und Schwefelverbindungen an die Zelle gebunden ist. Wir haben zellfreie Filtrate gut entwickelter thiooxidans-Kulturen hergestellt, den Filtraten erneut Schwefelblüte zugesetzt und durch anschließende tägliche pH-Messungen verfolgt, ob die Säuerung des Mediums fortschreitet. Es konnte gezeigt werden, daß durch das Abtrennen der Zellen die Säureproduktion unterbrochen wird (Abb. 5).

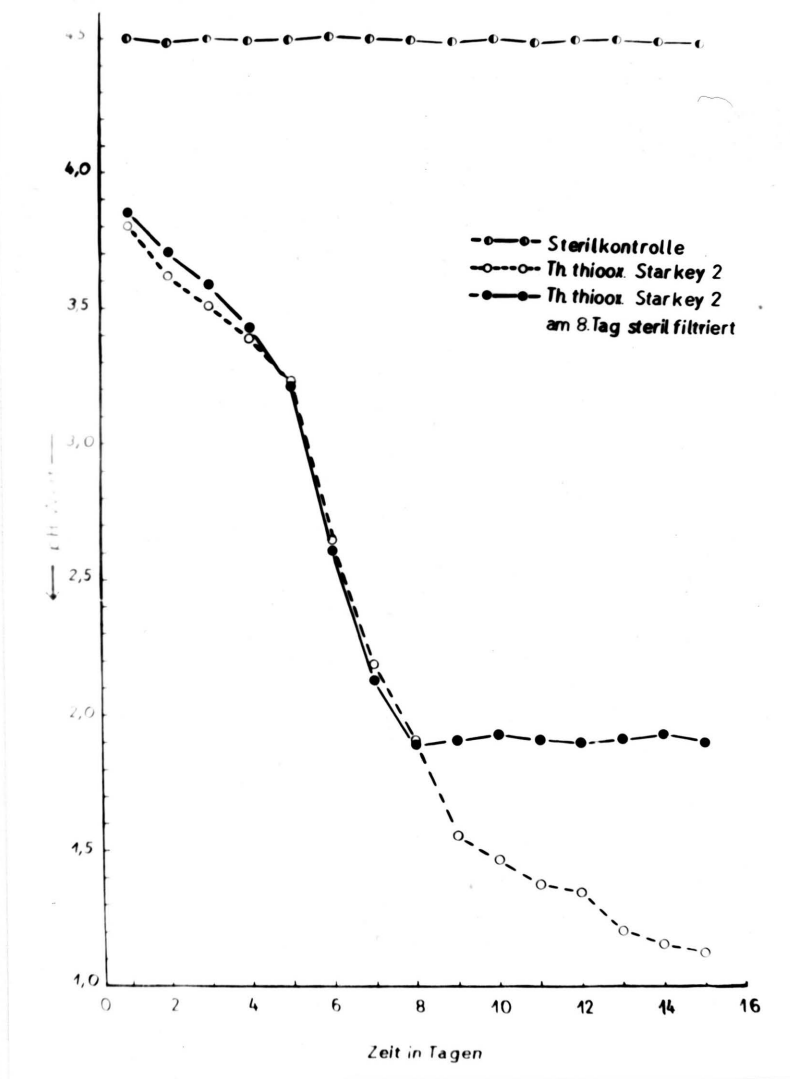


Abb. 5: Vergleichende Darstellung der Säureproduktion einer Th. thiooxidans Kultur und einer durch zellfreie Filtration unterbrochenen Kultur.

Nachdem über die Stickstoff-Ernährung von Th. thiooxidans recht verschiedene und einander widersprechende Versuchsergebnisse bekannt geworden waren (MC LEAN, 1918; LIPMAN, WAKSMAN u. JOFFE, 1921; WAKSMAN u. JOFFE, 1922 und ALLISON, 1923) hat STARKEY (1925) die Stickstoff-Ernährung von Th. thiooxidans eingehend untersucht und festgestellt, daß 0,04% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ für Wachstum und Schwefeloxydation am günstigsten sind, daß dagegen 0,05% KNO_3 die Säurebildung negativ beeinflussen und 1,25% KNO_3 toxisch wirken. Wir sind bei der gleichen Fragestellung zu abweichenden Resultaten gekommen.

Wir haben acht verschiedene thiooxidans-Stämme auf ihre Stickstoffausnutzung geprüft; darunter auch die drei Starkey-Stämme (Starkey 3 ist der Th. concretivorus von PARKER). Als Basalmedium diente STA/S ohne Stickstoffverbindung (Tab. 2).

Die hier verwendeten Gefäße wurden nach folgender Methode gereinigt:

3 Tage in gesättigter Kalilauge -
2 Tage in konzentrierter Salzsäure -
2 Tage in 60%igem Äthanol -
1 Tag in verdünnter Salzsäure -
mit Aqua dest. gespült und mindestens 3 Tage in Aqua dest. gewässert. Das Wasser wurde täglich erneuert und schließlich auf Cl^- -Freiheit geprüft.

Alle von uns untersuchten thiooxidans-Stämme können NH_4 , NO_3 und auch etwas Alanin verwerten, jedoch wirken höhere Gaben anorganischer Stickstoff-Verbindungen ungünstig. Dabei ist dem NO_3 in den meisten Fällen die stärkere Hemmung zuzuschreiben; jedoch ist noch bei 1,25% KNO_3 Entwicklung möglich.

Tabelle: 2 Verwertung von Stickstoff-Verbindungen durch verschiedene

Versuchsdauer 45 Tage

Kontrolle ohne Zuga- be einer N-Quelle		$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$			$\text{NH}_4\text{NO}_3^{+)$		KNO_3			
		0,04	0,5	1	0,024	0,06	0,1	0,2	0,5	1,2
		%	%	%	%	%	%	%	%	%
Boi 1	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+
Boi 4	+	+++	++	++	+++	+++	++	++	+	+
Boi 5	+	+++	++	++	+++	+++	++	++	+	+
K _o	+	+++	+++	++	+++	+++	+++	+++	++	++
Scot	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++
Starkey 1	+	+++	+++	++	+++	+++	+++	+++	++	++
Starkey 2	+	+++	++	++	+++	+++	+++	+++	++	++
Starkey 3	+	+++	++	++	+++	+++	+++	+++	++	+

Zeichenerklärung:

+++ sehr gutes Wachstum und Säurebildung (pH-Wert unter 1)

++ gutes Wachstum und Säurebildung (pH-Wert 1 bis 1,5)

+ mäßiges Wachstum und Säurebildung (pH-Wert 1,5 bis 3)

+) 0,04% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ entsprechen 0,024% NH_4NO_3 bzw. 0,06% KNO_3 oder 0,07% $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ oder 0,05% Alanin in Bezug auf Stickstoffgehalt.

Tabelle: 2 Verwertung von Stickstoff-Verbindungen durch verschiedene thiooxidans-Stämme.

Versuchsdauer 45 Tage

Kontrolle ohne Zuga- be einer N-Quelle		$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$			$\text{NH}_4\text{NO}_3^{+)$		KNO_3					$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$					<u>Alanin</u>	
		0,04	0,5	1	0,024	0,06	0,1	0,2	0,5	1,25	0,07	0,1	0,2	0,5	1,25	0,05	0,1	
		%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	
Bo1 1	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	+++	+++	+++	+++	+	+	+	
Bo1 4	+	+++	++	++	+++	+++	++	++	+	+	+++	+++	+++	++	+	+	+	
Bo1 5	+	+++	++	++	+++	+++	++	++	+	+	+++	+++	+++	++	+	+	+	
K ₀	+	+++	+++	++	+++	+++	+++	+++	++	++	+++	+++	+++	+++	++	++	++	
Scot	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	+++	+++	+++	+++	+	++	++	
Starkey 1	+	+++	+++	++	+++	+++	+++	+++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	
Starkey 2	+	+++	++	++	+++	+++	+++	+++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	
Starkey 3	+	+++	++	++	+++	+++	+++	+++	++	+	+++	+++	+++	+++	++	+	+	

Zeichenerklärung:

+++ sehr gutes Wachstum und Säurebildung (pH-Wert unter 1)

++ gutes Wachstum und Säurebildung (pH-Wert 1 bis 1,5)

+ mäßiges Wachstum und Säurebildung (pH-Wert 1,5 bis 3)

+) 0,04% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ entsprechen 0,024% NH_4NO_3 bzw. 0,06% KNO_3 oder 0,07% $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ oder 0,05% Alanin in Bezug auf Stickstoffgehalt.

en durch verschiedene thiooxidans-Stämme.

<u>KNO₃</u>				<u>Ca(NO₃)₂</u>					<u>Alanin</u>	
1	0,2	0,5	1,25	0,07	0,1	0,2	0,5	1,25	0,05	0,1
%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%
++	+++	++	+	+++	+++	+++	+++	+	+	+
+	++	+	+	+++	+++	+++	++	+	+	+
+	++	+	+	+++	+++	+++	++	+	+	+
++	+++	++	++	+++	+++	+++	+++	++	++	++
++	+++	++	++	+++	+++	+++	+++	+	++	++
++	+++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+
++	+++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++
+	+++	++	+	+++	+++	+++	+++	++	+	+

Wert unter 1)

1 bis 1,5)

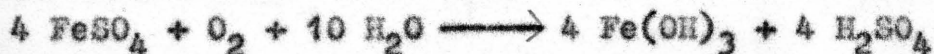
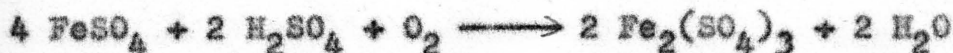
t 1,5 bis 3).

ozw. 0,06%

alanin in

2. Thiobacillus ferrooxidans.

Aus Eisensulfat wird unter Oxydation des Eisens Schwefelsäure gebildet (SILVERMAN u. LUNDGREN, 1959):



Der pH-Wert in LE-Lösung sinkt selbst bei langer Kulturdauer nur auf etwa 2,4 bis 2,6 (Abb. 6).

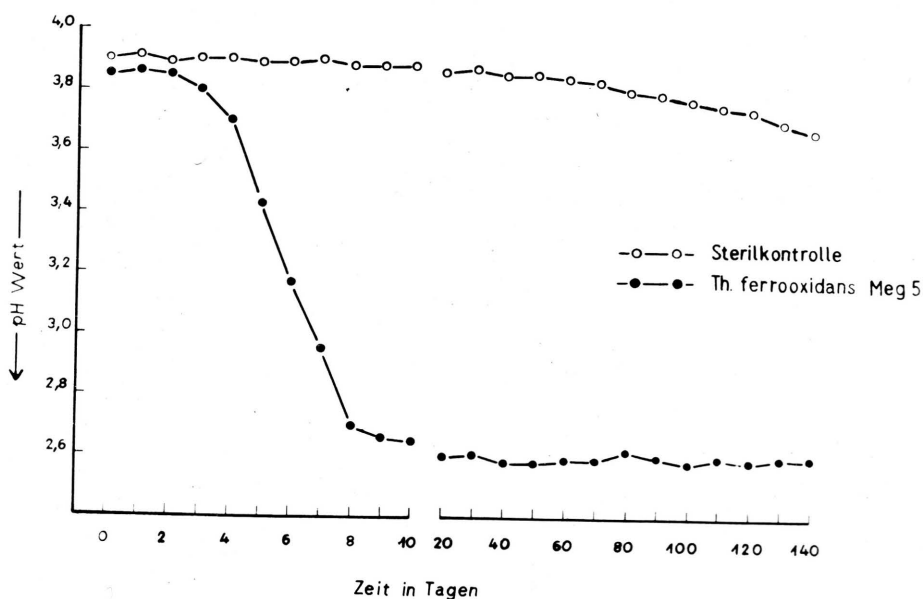


Abb. 6: Säuerung des Mediums durch Th. ferrooxidans, Stamm Meg 5.

Die Eisentoleranz ist erheblich; auch die doppelte und zehnfache, ja sogar sechzigfache Menge der für LE vorgeschriebenen Eisensulfatkonzentration (6% $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$) werden vertragen (Kap. VII). Selbst bei diesen Bedingungen sinkt der pH-Wert nicht unter 2,2.

Auch bei ferrooxidans sind Säurebildung und Zellvermehrung miteinander verbunden (Tab. 3). Erst in alten Kulturen, die nicht mehr säuern, geht die Keimzahl zurück.

Tabelle 3: Säurebildung und Keimgehalt in ferrooxidans-Kulturen, Stamm Meg 5

	<u>pH-Wert</u>	<u>Keimzahl/ml</u>
Versuchsbeginn	3,85	22×10^2
nach 10 Tagen	2,65	22×10^4
nach 50 Tagen	2,58	3×10^4
nach 140 Tagen	2,60	11×10^3

Der Keimgehalt wurde nach dem Titerverfahren ermittelt. BRYNER u.a. (1958) geben für die stationäre Phase ihrer Kulturen, bei Ermittlung der Keimzahlen über Silicagelplatten, 3×10^7 Zellen/ml an; das entspricht etwa dem hundertfachen Wert unserer Untersuchungen. FJERDINGSTAD (1956) kam mit dem Titerverfahren zu Ergebnissen, die unseren Werten entsprechen.

Nach zehntägiger Kultur ist die Säuerung im wesentlichen abgeschlossen. Das gilt allerdings nur für Stämme, die besonders aktiv sind. Andere Stämme erreichten stets erst nach zwanzig bzw. vierzig Tagen den End-pH-Wert von 2,6 (Abb. 7).

In vier Fällen gelang es, ferrooxidans-Stämme aus Braunkohle zu isolieren, die am natürlichen Standort Temperaturen von 50 bis 60°C entwickelt hatte. Eine Prüfung der Thermotoleranz ergab, daß diese Stämme bei 45°C gut wachsen, während die aus Grubenwasser isolierten Stämme

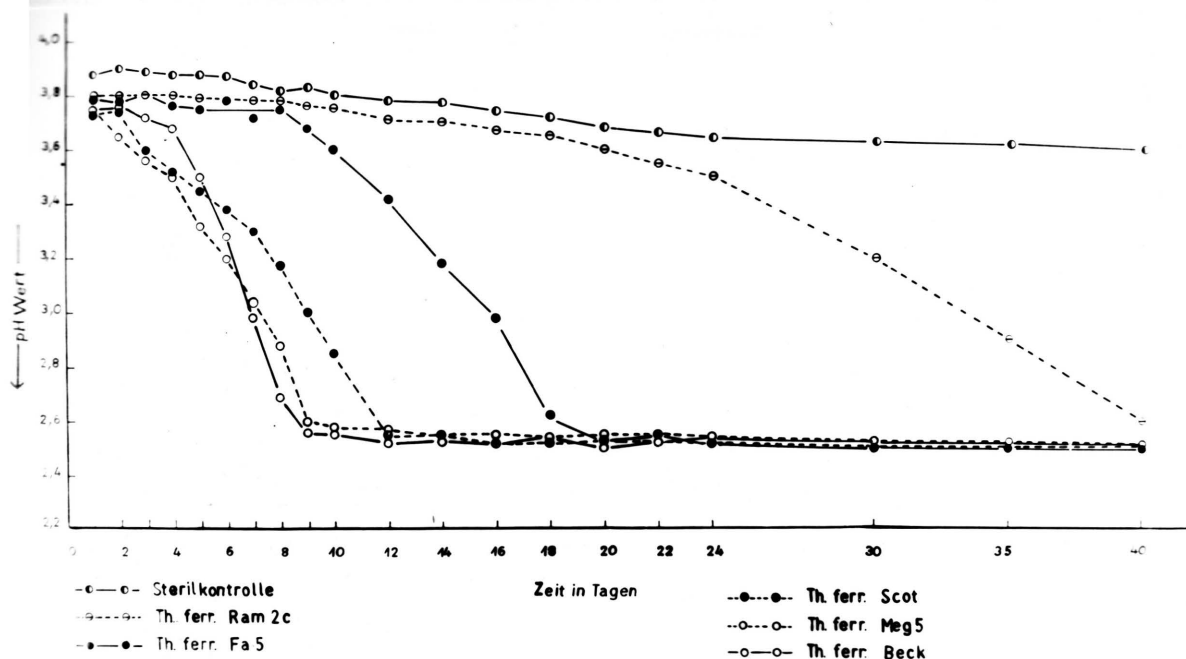


Abb. 7: Säureproduktion bei fünf verschiedenen *Th. ferrooxidans*-Stämmen.

zum größten Teil schon bei 37°C das Wachstum einstellen (Tab. 4), bei 45°C aber absterben, wie auch durch die Untersuchungen von SILVERMAN u. LUNDGREN (1959) bekannt geworden ist. Keiner der geprüften Stämme wuchs bei 50°C .

Es zeigte sich, daß Stamm Ram 2c relativ hohe Temperaturansprüche stellt (30 bis 35°C) und deshalb bei der gewöhnlichen Kulturtemperatur von 25°C etwas langsamer wächst (vergl. Abb. 7).

Wir haben vergleichsweise auch einige unserer thiooxidans-Stämme geprüft. Sie zeigten durchweg mesophiles Verhalten. Durch EMOTO (1928 u. 1929) und BAUDISCH (1935) ist bekannt geworden, daß *Thiobacillus thiooxidans* auch in Schwefelthermen vorkommt, deshalb muß man bei dieser Art ebenfalls mit dem Vorkommen thermophiler Rassen rechnen.

Tab. 4: Thermotoleranz von Th. ferrooxidans u. thiooxidans.

Versuchsdauer 30 Tage

Stamm			25°C	31°C	35°C	37°C	45°C	50°C
Th. ferrooxidans	Beck		+++	+++	++	-	-	-
"	"	B1 6	+++	+++	++	+	-	-
"	"	Bol 3	+++	+++	+	-	-	-
"	"	Elb 4	+++	+++	+	+	-	-
"	"	Fa 5	+++	+++	+	-	-	-
"	"	G 1	+++	+++	+++	+++	+++	-
"	"	G 2	+++	+++	+++	+++	++	-
"	"	G 3	+++	+++	+++	+++	+++	-
"	"	G 4	+++	+++	+++	+++	+++	-
"	"	K 2	+++	+++	+	-	-	-
"	"	Meg 5	+++	+++	+	-	-	-
"	"	Ram 2c	++	+++	+++	+++	-	-
"	"	Scot	+++	+++	++	+	-	-
"	thiooxidans	Bol 5	+++	+++	+	-	-	-
"	"	K ₀	+++	+++	+	-	-	-
"	"	Starkey 1	+++	+++	+	-	-	-
"	"	Starkey 2	+++	+++	+	-	-	-

Zeichenerklärung:

+++ sehr gutes Wachstum

++ gutes Wachstum

+ mäßiges Wachstum

Neben der Thermotoleranz interessierte das Verhalten von *Th. ferrooxidans* unter anaeroben Bedingungen. Es wurden Kulturen in LE-Medium in 50 ml-Säureflaschen angelegt, die vollständig gefüllt und mit Wachs abgedichtet waren.⁺)

Erstaunlicherweise wuchs *Th. ferrooxidans* unter diesen Bedingungen und bildete Säure, wenn auch in etwas größeren Zeiträumen (durchschnittlich 20 bis 30 Tage) als bei aeroben Verhältnissen. Mehrere Folgen von Subkulturen verhielten sich entsprechend. *Thiobacillus ferrooxidans* verhält sich nach den bis jetzt vorliegenden Erfahrungen wie ein microaerophiler Organismus, gleicht also in dieser Beziehung *Leptothrix ochracea* (CHARLET u. SCHWARTZ, 1954).

Vergleichsweise angelegte Kulturen von *Th. thiooxidans* auf STA/S unter anaeroben Bedingungen führten zu dem eindeutigen Ergebnis, daß die hier geprüften Stämme nicht zu anaerober oder microaerophiler Lebensweise befähigt sind.

Zur Denitrifikation sind beide Arten nicht fähig; denn bei anaerober Kultur in LE bzw. STA/S-Medium mit 0,1% KNO_3 wurde kein Gas gebildet und die Nitrit-Reaktion mit α -Naphthylamin und Sulfanilsäure blieb negativ.

⁺) Die Reinigung der Gefäße erfolgte nach der auf S. 15 zitierten Methode.

3. Bemerkungen zur Taxonomie der Gattung Thiobacillus.

Zunächst ist zu beachten, daß der Gattungsname *T h i o - b a c i l l u s* irreführen kann, denn es handelt sich keinesfalls um Sporenbildner, wie noch einmal bei allen uns zur Verfügung stehenden Stämmen geprüft wurde: 10 min. Erhitzen auf 80°C werden nicht vertragen. Gleiches gilt für das Austrocknen über längere Zeit. Mittels Sporenfärbetechnik nach MÖLLER lassen sich Sporen nicht nachweisen. Im Sinne einer exakteren Nomenklatur wäre der Gattungsname *T h i o b a c - t e r i u m* zu bevorzugen. Die von JANKE (1924) aufgestellte Gattung *Thiobacterium* ist nicht genügend definiert und anscheinend nicht wieder gefunden worden.

In unserem Zusammenhang interessierten nur drei Vertreter der Gattung *Thiobacillus*: *ferrooxidans*, *thiooxidans* und *concretivorus*.

Thiobacillus ferrooxidans, COLMER u. TEMPLE, 1951 ist sicher identisch mit *Ferrobacillus ferrooxidans*, LEATHEN u. BRALEY, 1954. Obwohl dieser Organismus seine Energie vorwiegend aus der Oxydation des zweiwertigen Eisens gewinnt, kann man ihn in die Gattung *Thiobacillus* einordnen, denn er ist maßgeblich an der Oxydation sulfidischer Erze beteiligt (LEATHEN, BRALEY u. MC INTYRE, 1953) und muß in diesem Zusammenhang den freiwerdenden Schwefel zu Sulfat oxydieren (BRYNER u. JAMESON, 1958).



Wir halten die Aufstellung einer eigenen Gattung *Ferrobacillus* nicht für erforderlich.

PARKER u. TEMPLE haben in BERGEY's Manual of Determinative Bacteriology (7. Auflage, 1957) neben *Thiobacillus thiooxidans* eine von PARKER (1945) isolierte Art *Th. concretivorus* beibehalten, die sich von *thiooxidans* im wesentlichen nur durch das Verhalten gegenüber Stickstoffverbindungen unterscheiden soll (Tab. 5). Danach wären unsere sämtlichen Stämme, darunter auch die Original-Stämme von STARKEY zu *concretivorus* zu stellen. Wir sind jedoch mit VISHNIAC (1957) der Meinung, daß in diesem Fall die Trennung in zwei Arten ungerechtfertigt ist.

Tabelle 5: Gegenüberstellung der Artdiagnosen von Th. ferrooxidans,

(Nach BERGNY's Manual of Determinative Bacteriology, 7. Aufl.)

Thiobacillus ferrooxidans COLMER u. TEMPLE, 1954	Thiobacillus thiooxidans WAKSMAN u. JOFFE, 1922
Karststäbchen, 0,5 x 1µ, mit abgerundeten Enden	Stäbchen, 0,5 x 1µ, mit abgerundeten Enden
beweglich	beweglich
gramnegativ	gramnegativ
auf Thiosulfat-Agar sehr kleine, dünne Kolonien; bei langer Kultur auf thiosulfatfreien Medien geht die Fähigkeit zur Thiosulfat-Oxydation verloren	auf Thiosulfat-Agar spärliches Wachstum, nahezu transparente Kolonien
in Thiosulfat-Nährlösung einheitliche Trübung und feine Haut; in Ferro-lösungen Bildung von Fe(OH) ₃	in Thiosulfat-Nährlösung einheitliche Trübung und Schwefelabscheidung
aerob bis mikroaerophil, streng autotroph	streng aerob, streng autotroph
Temperatur-Maximum zwischen 45 und 50°C	Temperatur-Optimum 28 bis 30°C Temperatur-Maximum zw. 55 u. 60
NH ₄ wird besser verwertet als NO ₃	NH ₄ wird verwertet, NO ₃ wirkt toxisch (STARKEY), unsere Stämme verwerten NO ₃
Energiegewinn durch Oxydation von Schwermetall-Sulfiden, besonders Markasit, von sonstigen Ferro-Verbindungen, von Thiosulfat und Schwefel	Energiegewinn durch Oxydation von Schwefel oder Thiosulfat unter H ₂ SO ₄ -Bildung (PARKER). Unsere Stämme verwerten auch frisch gefälltes Kupfersulfid
pH-Optimum 2,5 bis 5,8 über pH 6 kein Wachstum	pH-Optimum 2 bis 3,5 verträgt unter den bekannten Organismen die stärkste Säurekonzentration, z.B. pH 0,6 und weniger
Habitat: Saure Grubenwässer und Pyrit- bzw. Markasit-führende Böden, Lagerstätten sulfidischer Erze, Schwefelkies- und Markasit-führende Kohlenflöze, Sedimentgestein und Sedimente	

Tabelle 5: Gegenüberstellung der Artdiagnosen von Th. ferrooxidans.

(Nach BERGEY's Manual of Determinative Bacteriology, 7. Auflage, 1957; ergänzt durch eigene Beobachtungen)

Thiobacillus ferrooxidans COLMER u. TERPIL, 1954	Thiobacillus thiooxidans WAKSMAN u. JOFFE, 1922	Thiobacillus concretivorus PARKER, 1945
Kästchen, 0,5 x 1,5 μ , mit abgerundeten Enden	Stäbchen, 0,5 x 1,5 μ , mit abgerundeten Enden	Stäbchen, 0,5 x 1,5 bis 2 μ , mit geraden Enden
beweglich	beweglich	beweglich
gramnegativ	gramnegativ	gramnegativ
auf Thiosulfat-Agar sehr kleine, dünne Kolonien; bei langer Kultur auf thiosulfatfreien Medien geht die Fähigkeit zur Thiosulfat-Oxydation verloren	auf Thiosulfat-Agar spärliches Wachstum, nahezu transparente Kolonien	auf Thiosulfat-Agar kleine, wasserklare Kolonien
in Thiosulfat-Nährlösung einheitliche Trübung und feine Haut; in Ferre-Lösungen Bildung von $\text{Fe}(\text{OH})_3$	in Thiosulfat-Nährlösung einheitliche Trübung und Schwefelabscheidung	in Thiosulfat-Nährlösung einheitliche Trübung und etwas Schwefelabscheidung, keine Haut
aerob bis mikroaerophil, streng autotroph	streng aerob, streng autotroph	streng aerob, streng autotroph
Temperatur-Maximum zwischen 45 und 50 °C	Temperatur-Optimum 28 bis 30 °C Temperatur-Maximum zw. 55 u. 60 °C	Temperatur-Optimum 28 °C Temperatur-Maximum 55 °C
NH_4 wird besser verwertet als NO_3	NH_4 wird verwertet, NO_3 wirkt toxisch (STARKY), unsere Stämme verwerten NO_3	NH_4 und NO_3 werden gleich gut verwertet
Energiegewinn durch Oxydation von Schwermetall-Sulfiden, besonders Markasit, von sonstigen Ferro-Verbindungen, von Thiosulfat und Schwefel	Energiegewinn durch Oxydation von Schwefel oder Thiosulfat unter H_2SO_4 -Bildung (PARKER). Unsere Stämme verwerten auch frisch gefälltes Kupfersulfid	Energiegewinn durch Oxydation von Schwefel bzw. Thiosulfat oder H_2S unter H_2SO_4 -Bildung
pH-Optimum 2,5 bis 5,8 über pH 6 kein Wachstum	pH-Optimum 2 bis 3,5 verträgt unter den bekannten Organismen die stärkste Säurekonzentration, z.B. pH 0,6 und weniger	pH-Optimum 2 bis 4 Wachstum zwischen pH 6 und nach PARKER bis zu Säurekonzentrationen von 10%
Habitat: Saure Grubenwässer und Pyrit- bzw. Markasit-führende Böden, Lagerstätten sulfidischer Erze, Schwefelkies- und Markasit-führende Kohlenflöze, Sedimentgestein und Sedimente		verursacht Korrosion an Beton-Abwasser- röhren und sonstigen Betonmaterial in H_2S -Atmosphäre, weitere Standorte sind Böden und Wasser

B. ferrooxidans,

Microbiolog, 7. Auflage, 1957; ergänzt durch eigene Beobachtungen)

B. thiooxidans
1. JOFFE, 1922

Thiobacillus concretivorus
PARKER, 1945

1 μ , mit abgerun-

Stäbchen, 0,5 x 1,5 bis 2 μ , mit
geraden Enden

beweglich

gramnegativ

-Agar spärliches
zu transparente

auf Thiosulfat-Agar kleine, wasser-
klare Kolonien

Nährlösung einheit-
und Schwefelab-

in Thiosulfat-Nährlösung einheitliche
Trübung und etwas Schwefelabscheidung,
keine Haut

streng autotroph

streng aerob, streng autotroph

tem 28 bis 30°C
tem zw. 55 u. 60°C

Temperatur-Optimum 28°C
Temperatur-Maximum 55°C

rtet, NO₃ wirkt
BY), unsere Stämme

NH
NH₄ und NO₃ werden gleich gut verwertet

durch Oxydation von
Thiosulfat unter
(PARKER). Unsere
en auch frisch ge-
sulfid

Energiegewinn durch Oxydation von
Schwefel bzw. Thiosulfat oder H₂S
unter H₂SO₄-Bildung

is 3,5
den bekannten Orga-
nische Säurekonzent-
pH 0,6 und weniger

pH-Optimum 2 bis 4
Wachstum zwischen pH 6 und nach PARKER
bis zu Säurekonzentrationen von 10%

t-führende Böden,
arkasit-führende

verursacht Korrosion an Beton-Abwasser-
röhren und sonstigen Betonmaterial in
H₂S-Atmosphäre, weitere Standorte sind
Böden und Wasser

V. Die Pilzflora der sauren Grubenwässer.

Der Pilzflora dieser Standorte wurde bisher wenig Beachtung geschenkt. Einige Autoren (ASHMEAD, 1955; COLMER u. HINKLE, 1947) erwähnten lediglich das Vorkommen von Pilzen, ohne die Biocoenose zu analysieren. Wir haben die uns zur Verfügung stehenden Wasserproben auf ihren Pilzbestand untersucht und fanden eine Fülle verschiedener Pilze, besonders aus der Gruppe der Fungi imperfecti. Einige erwiesen sich allerdings als ephemere Luftkeime, die bei ständiger Mischkultur mit Thiobakterien nicht mehr zur Entwicklung kamen. Sie vertragen also ein dem Grubenwasser entsprechendes Biotop nicht auf die Dauer. Ihre Sporen gelangen vermutlich durch die Wetterführung der Gruben oder durch den Menschen an die betreffenden Standorte. In diese Gruppe gehören z.B. *Aspergillus awamori*, *Spicaria simplicissima* und einige *Mucoraceen*. Bei Keimgehaltsbestimmungen waren sie jeweils nur in 2 bis 3 Proben in geringer Zahl im Grubenwasser vorhanden. Die zur Biocoenose gehörenden Arten (Tab. 6) waren meist in größeren Mengen und oft auch an mehreren weit voneinander entfernten Standorten im Grubenwasser vertreten. Auch bei ständiger Mischkultur mit Thiobakterien zeigten sie gute Entwicklung.

Pullularia pullulans war in der Mehrzahl der Proben vorhanden; man könnte sie als eine Leitform unter den Pilzen bezeichnen. Sie trat stets auch mit großer Häufigkeit auf. Bei einer Keimgehaltsbestimmung der Probe B1 4 fanden wir etwa 400 *Pullularia*-Keime pro ml. Allerdings

verursachte die Bestimmung dieses Pilzes einige Schwierigkeiten, da es sich um einen recht pleomorphen Organismus handelt. Je nach den Kulturbedingungen sind Sproßkonidien, Fadenmycel, Sproßmycel mit wechselnden Mengen von Dauercellen und mit stärkerer oder schwächerer Schleimbildung anzutreffen. Unsere Stämme bildeten auch in der Reinkultur kaum die für die Identifizierung wichtigen Sproßkonidien. Nach BOAS u. BAUER (1937) wird die Sproßkonidien-Bildung durch hohe H^+ -Konzentrationen (pH 3,6 bis 3,9) unterdrückt. Da es sich in unserem Falle um Stämme handelt, die lange Zeit einem Milieu mit hoher H^+ -Konzentration (pH 1,5 bis 3,0) ausgesetzt waren, ist es denkbar, daß sie die Fähigkeit zur Sproßkonidienentwicklung verloren haben.

Neben Pullularia sind auch Hefen aus der Gattung Rhodotorula als häufige Begleiter der Thiobakterien zu beachten. Bei einer Keimgehaltsbestimmung des Wassers aus Grube Einheit/Elbingerode wurden 500 bis 600 Rhodotorula rubra-Zellen/ml gefunden. Entsprechendes gilt auch für die Proben aus Falun.

Tabelle 6: Verbreitung der Pilze in verschiedenen Abwasserproben.

	Bing	Bi	Bol	Elb	Em	Fa	Freib	H	K	Meg	M	Ram	Scot
<i>Phl.pullulans</i>	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-
<i>Pen.turbatum</i>	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-
<i>Pen.waksmani</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
<i>Pen.decumbens</i>	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-
<i>Pen.frequentans</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
<i>Spic.divaricata</i>	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-
<i>Rhod.glutinis</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Rhod.rubra</i>	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+

VI. Einfluß der Pilze auf die Entwicklung der Thiobakterien und die Säurebildung.

TEMPLE u. KOEHLER (1954) vermuten, daß die in der Biocoenose vorkommenden Hefen Wachsstoffe abgeben und somit Wachstum und Säureproduktion der Thiobakterien positiv beeinflussen. Aufgrund der Studien von FRANTZ, FEIGELMAN, WERNER u. SMITH (1952) ist bekannt, daß Th. thiooxidans zur Synthese von 17 Aminosäuren befähigt ist. O'KANE (1942) gibt an, daß das Kulturfiltrat von Th. thiooxidans folgende Wachsstoffe enthält: Nikotinsäure, Pantothensäure, Biotin, Riboflavin, Thiamin und Pyridoxin.

Wir haben Th. thiooxidans bzw. Th. ferrooxidans-Reinkulturen, Rhodotorula glutinis-Reinkulturen und Mischkulturen,

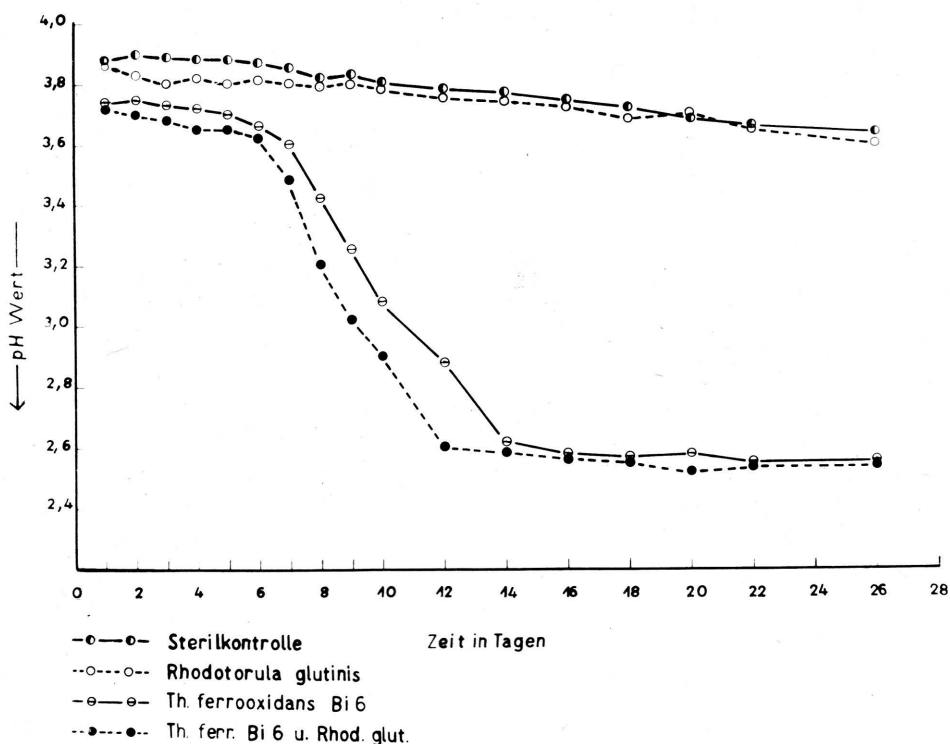


Abb. 8: Verlauf der Säurebildung in Reinkultur und Mischkultur von Th. ferrooxidans und Rhodotorula glutinis.

turen beider Organismen in STA/S bzw. LE-Lösung angelegt und durch tägliche pH-Messungen die Säureproduktion verfolgt. Es ergibt sich für ferrooxidans eine kaum nennenswerte Beschleunigung der Säurebildung in der Mischkultur (Abb. 8). Entsprechendes gilt für thiooxidans.

Mit *Spicaria divaricata* bzw. *Penicillium waksmani* blieb die Säurebildung bei einigen Stämmen von *Th. ferrooxidans* durchschnittlich um zehn Tage zurück, erreichte aber dann doch den Endwert der Reinkulturen (Abb. 9 u. 10).

Die meisten Pilze verhalten sich jedoch gegenüber der Bakterienentwicklung, gemessen an der Säurebildung, indifferent; so z.B. *Penicillium turbatum* (Abb. 11).

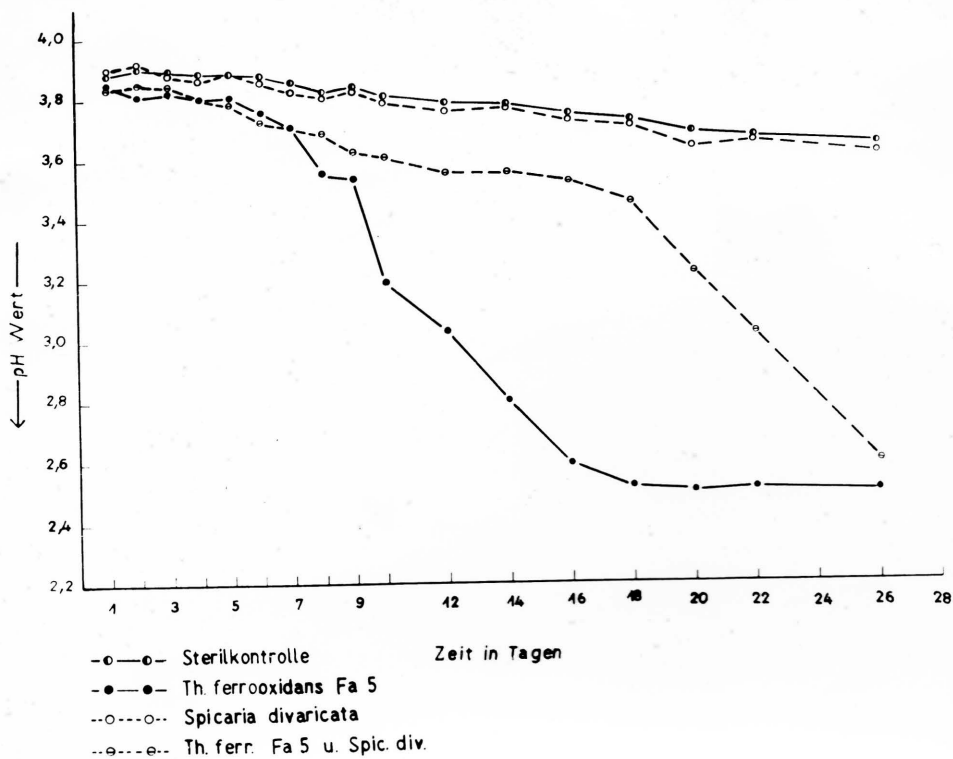


Abb. 9: Verlauf der Säurebildung in Reinkultur und Mischkultur von *Th. ferrooxidans* und *Spicaria divaricata*.

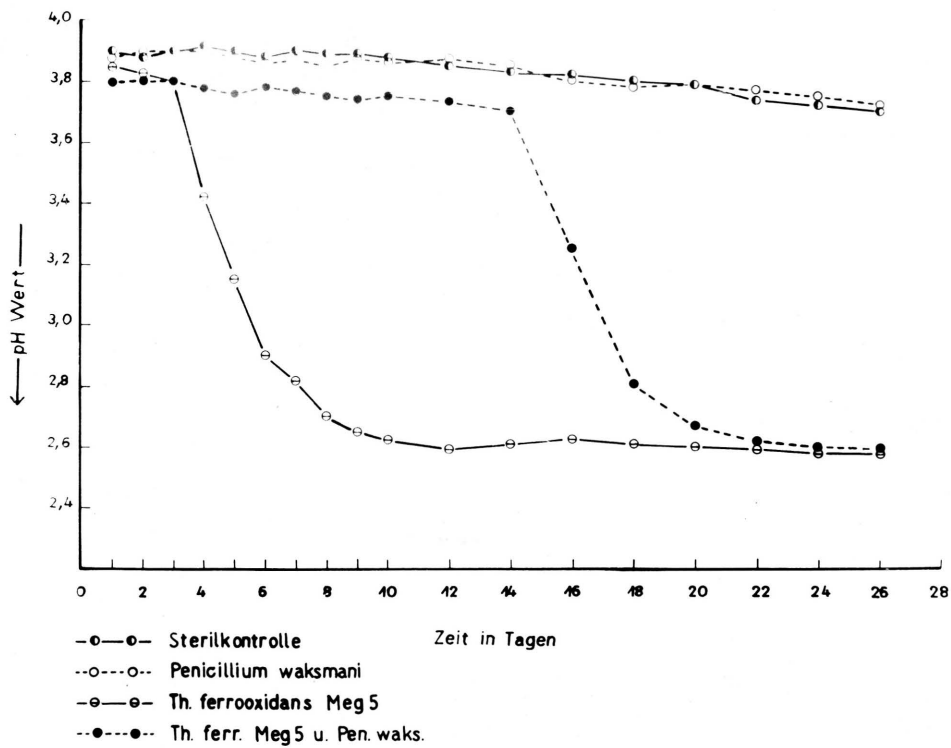


Abb. 10: Verlauf der Säurebildung in Reinkultur und Mischkultur von *Th. ferrooxidans* und *Penicillium waksmani*.

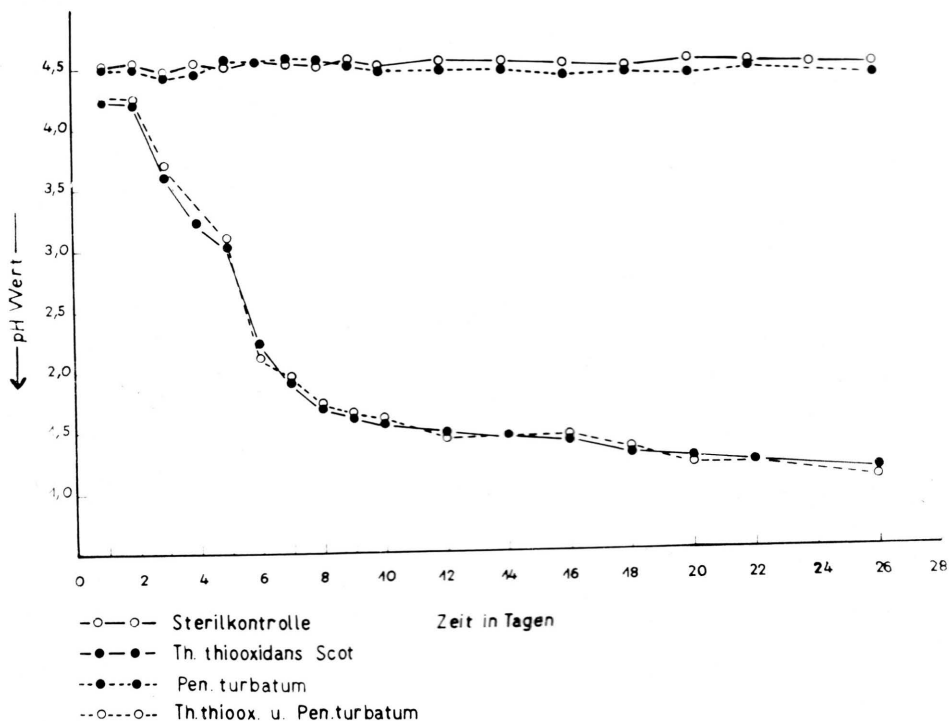


Abb. 11: Verlauf der Säurebildung in Reinkultur und Mischkultur von *Th. thiooxidans* u. *Penicillium turbatum*.

Bemerkenswert ist allerdings die üppige Entwicklung der Pilze in den anorganischen Medien (Abb. 12 u. 13). Andererseits wissen wir, daß manche Penicillien sehr anspruchslos sind und sogar in 5% iger Schwefelsäure noch wachsen können. In unserem Fall gibt es genügend Quellen der organischen Verunreinigung, so z.B. die Chemikalien, einfach destilliertes Wasser, das Impfmateriäl und besonders abgestorbene Thiobakterien.

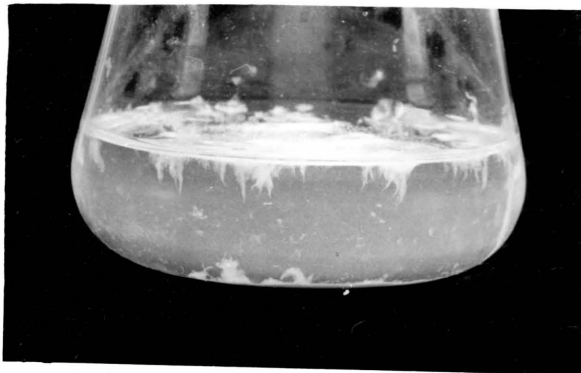


Abb. 12: *Th. thiooxidans* (Stamm Scot) - *Pen. turbatum*-Mischkultur.
Mycelbildung des *Penicillium* in STA/S-Medium.

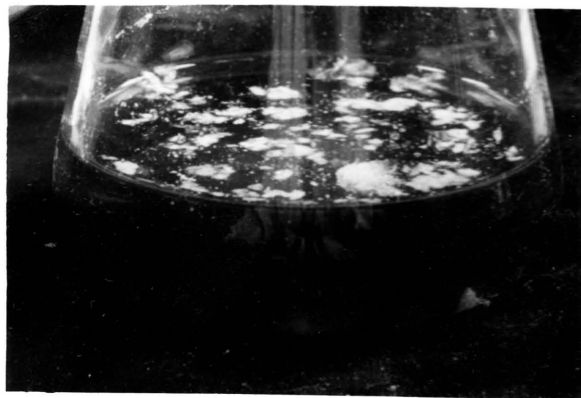


Abb. 13: *Th. ferrooxidans* (Stamm B1 6) - *Pen. waksmani*-Mischkultur.
Pilzkolonien auf der Oberfläche der LE-Lösung.
(Die Nährlösung wurde angefärbt, um die Pilzkolonien besser sichtbar zu machen.)

Wir haben eine größere Zahl von Stämmen der beiden Thiobacillus-Arten mit Pilzen in Mischkultur gehalten und bei einer Versuchsdauer von 30 bis 60 Tagen täglich die pH-Werte bestimmt (Tab. 7 u. 8).

Tabelle 7: Einfluß verschiedener Pilze auf die Säuerung des Mediums durch Th. thiooxidans.

Pilz-Stamm	Bol1	K ₀	Scot	Stark.1	Stark.2	Stark.3
Pul.pullulans B14	+	0	0	+	0	+
Spic.divaric. Ram 2b	0	0	0	+	-	0
Pen.turbatum H6	0	0	0	+	0	+
Pen.waksmani Ram 2b	0	0	0	+	0	+
Rhod.glutinis B16	+	0	+	+	0	+
Rhod.rubra Bing	0	0	+	+	0	+
Rhod.rubra Fa3	+	0	+	0	0	+
Rhod.rubra Scot	+	+	0	+	0	+

Tabelle 8: Einfluß verschiedener Pilze auf die Säuerung des Mediums durch Th. ferrooxidans.

Pilz-stamm	Beck	B16	Bol3	Fa5	K2	Meg5	Ram2c	Scot
Pul.pullulans B14	0	0	0	0	0	0	0	0
Spic.divaric. Ram2b	0	-	-	—	0	-	-	0
Pen.turbatum H6	0	0	0	0	0	0	0	0
Pen.waksmani Ram2b	-	0	-	-	0	—	0	0
Rhod.glutinis B16	0	0	0	0	+	0	0	0
Rhod.rubra Bing	+	+	+	0	+	0	0	0
Rhod.rubra Scot	+	0	+	0	+	0	0	+

Zeichenerklärung: + Förderung um 2 bis 5 Tage
 - Verzögerung um 2 bis 5 Tage
 — Verzögerung um mehr als 5 Tage
 0 kein Einfluß.

Tabelle 9: Vergleichende Betrachtung des Einflusses
verschiedener Pilze.

Pilze	Th.thiooxidans			Th.ferrooxidans		
	+	-	0	+	-	0
Pullularia pullulans B14	3/6	-	3/6	-	-	8/8
Spicaria divaricata Ram2b	1/6	1/6	4/6	-	5/8	3/8
Penicillium turbatum H6	2/6	-	4/6	-	-	8/8
Penicillium waksmani Ram2b	2/6	-	4/6	-	4/8	4/8
Rhodotorula glutinis B16	4/6	-	2/6	1/8	-	7/8
Rhodotorula rubra Bing	3/6	-	3/6	4/8	-	4/8
Rhodotorula rubra Fa3	4/6	-	2/6	nicht geprüft		
Rhodotorula rubra Scot	3/6	-	3/6	4/8	-	4/8

Betrachtet man das Verhältnis der geförderten zu den gehemmten Thiobakterien-Stämmen (Tab. 9), so ist am häufigsten eine Förderung durch Hefen zu beobachten. Innerhalb der thiooxidans-Stämme sind es besonders Starkey 1 und Starkey 3, die in Mischkulturen etwas rascher Säure bilden als in Reinkultur. Diese beiden Stämme sind durch schwächere Entwicklung ausgezeichnet als die restlichen thiooxidans-Stämme (vergl. Abb. 4). Möglicherweise erhalten sie fehlende oder nicht in ausreichender Menge gebildete Wachstoffsstoffe von den begleitenden Pilzen.

Wir haben nun alle acht in Tab. 7 genannten Pilze in STA/S gebracht, 7 Tage bebrütet, sodaß sich die Pilze gut entwickeln konnten und anschließend keimfrei filtriert. Dieses Filtrat wurde erneut mit Schwefelblüte beschiokt und dann mit Starkey 1 bzw. Starkey 3 beimpft. Anschließend

haben wir durch tägliche pH-Messungen die Säurebildung verfolgt. Der fördernde Einfluß dieses komplexen Pilzfiltrates war jedoch kaum stärker als der eines einzelnen Pilzes. Die Förderung erstreckte sich im Maximum auf fünf Tage.

Mischkulturen der ferrooxidans-Stämme Fa 5 bzw. Meg 5 mit den drei Rhodotorula-Stämmen ergaben eine Förderung von maximal drei Tagen; was in diesen Fällen beachtlich ist, da die einzelnen Hefen in Mischkultur mit ferrooxidans indifferent waren (Tab. 8).

Legt man Mischkulturen des ferrooxidans-Stammes Scot mit *Spicaria divaricata* und *Penicillium waksmani* an, ist keine Hemmwirkung zu verzeichnen, obwohl gerade diese beiden Pilze die Säuerung in der Mehrzahl der anderen ferrooxidans-Stämme hemmend beeinflussen.

VII. Verhalten der Thiobakterien gegenüber Eisen-

Kupfer- und Zinksulfat.

Das hier untersuchte Biotop der Thiobakterien ist durch das Vorkommen verschiedener Schwermetalle in sulfidischer Form gekennzeichnet. Abgesehen von Kohlenflözen ist Eisen meistens von wechselnden Mengen Kupfer, Zink, Nickel, Blei, Molybdän und anderen Metallen begleitet.

Wir haben bis jetzt das Verhalten der Thiobakterien gegenüber Eisen-, Kupfer- und Zinksulfat geprüft.

Die Eisentoleranz der Th. thiooxidans- und ferrooxidans-Stämme ist erheblich (Tab. 10 u. 11). Das Eisen wurde als Ferrosulfatlösung den Stammlösungen STA/S bzw. LE nach der Sterilisation zugesetzt. Da die Eisentoleranz der meisten Stämme relativ hoch war, wurde von Adaptationsversuchen Abstand genommen.

Tabelle 10: Eisentoleranz der Th. thiooxidans-Stämme.

Versuchsdauer 40 Tage

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

Zeichenerklärung wie Tab. 2

Tabelle 11: Eisentoleranz der Th. ferrooxidans-Stämme.

Versuchsdauer 40 Tage

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

Zeichenerklärung: +++ sehr gutes Wachstum, pH 2,6 n. 10d erreicht
++ gutes Wachstum, pH 2,6 nach 20d erreicht
+ mäßiges Wachstum, pH 2,6 nach 40d erreicht

Wie bei Eisensulfat, so sind besonders gegenüber Kupfersulfat erhebliche Unterschiede zwischen den beiden Arten und desgleichen zwischen verschiedenen Stämmen derselben Art vorhanden (Tab. 12 u. 13).

Es zeigte sich im allgemeinen eine deutliche Beziehung der Kupferverträglichkeit zu dem ursprünglichen Standort des jeweiligen Bakterienstammes. Wurde er von einem Schwermetall-armen Habitat isoliert, war seine Kupfertoleranz gering; Stämme aus Kupfergruben (z.B. Bi 6 u. Bol 3) erwiesen sich dagegen als sehr kupfertolerant. Die gleichen Beziehungen blieben in den meisten Fällen auch nach wiederholten Adaptationsversuchen erhalten (Tab. 14).

Tabelle 12: Kupfertoleranz der Th. thiooxidans-Stämme.

Versuchsdauer 40 Tage

Stamm	Kupfergehalt pro Liter							
	250γ	500 γ	2,5mg	5mg	25mg	50mg	250mg	500mg
Bol 1	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	-
Bol 4	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	-
Fa 5	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++
K ₀	+++	+++	+++	+++	++	-	-	-
K 5	+++	+++	+++	+++	++	+	-	-
Meg 5	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+
Scot	+++	+++	+++	+++	++	+	-	-
Starkey 1	+++	++	-	-	-	-	-	-
Starkey 2	+++	++	++	-	-	-	-	-
Starkey 3	+++	+++	++	+	-	-	-	-

Zeichenerklärung wie Tab. 2

Tabelle 13: Kupfertoleranz der Th. ferrooxidans-Stämme.

Versuchsdauer 40 Tage

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

Um die Bakterien an höhere Kupferkonzentrationen zu adaptieren, wurden von jedem Stamm die beiden Kulturen stärkster Toleranz ausgelesen und jeweils auf STA/S bzw. LE mit der gleichen und der doppelten bzw. fünffachen Kupferkonzentration geimpft. So gelang es allmählich einige Stämme an eine höhere Kupferkonzentration zu adaptieren. In Tab. 14 ist der maximale Kupfergehalt angegeben, der nach sieben Passagen mit steigenden Kupfersulfat-Gaben noch normales Wachstum und Säurebildung zulässt.

Tabelle 14: Adaptation von Th. thiooxidans und Th. ferrooxidans an höhere Kupferkonzentrationen.

Th. thiooxidans		Th. ferrooxidans	
Stamm	vertr. max. g Cu/l ⁺)	Stamm	vertr. max. g Cu/l
K ₀	5,0	Beck	5,0
Bol 1	2,5	B1 6	5,0
Bol 4	2,5	Bol 3	5,0
Fa 5	0,5	Fa 5	2,5
Meg 5	0,5	Meg 5	2,5
Starkey 3	0,5	Scot	2,5
Scot	0,25	K 2	0,5
K 5	0,05	Ram 2c	0,05
Starkey 2	0,025		
Starkey 1	0,005		

+) Bei Kupferkonzentrationen über 250mg/l war in den gut entwickelten thiooxidans-Kulturen nach etwa 14 Tagen ein schwarzer Belag auf der Schwefelblüte zu beobachten. Es handelt sich weder um Desulfurizierer (wiederholte Abimpfungen auf Desulfurizierer-Nährlösung nach STARKEY, 1945, blieben negativ) noch um Pullularia-Verunreinigungen. Die mikroskopische Kontrolle ergab kristalline Bestandteile (Kupfersulfid-Bildungen). Bei der Autolyse der thiooxidans-Zellen entsteht H₂S (in Spuren mit Bleiacetat-Papier nachgewiesen), das im sauren Milieu Cu⁺⁺ als Kupfersulfid ausfällt.

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. 15 u. 16). Letztere lassen sich aber leichter an höhere Zinksulfatgaben gewöhnen. Nach drei Passagen (Tab. 17) werden z.T. 11%ige Zinksulfat-Lösungen vertragen (eine 11%ige Lösung von $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ enthält 25g Zn/l).

Tabelle 15: Zinktoleranz der Th. thiooxidans-Stämme.

Versuchsdauer 40 Tage

Stamm	Zinkgehalt pro Liter						
	5mg	25mg	50mg	250mg	500mg	2,5g	5g
Bol 1	+++	+++	+++	+++	+++	++	+
Bol 4	+++	++	++	+	-	-	-
Bol 5	+++	++	+	-	-	-	-
Elb 10	+++	+++	+++	++	++	++	+
K _o	+++	+++	+++	+++	+++	++	+
Soot	+++	+++	+++	+++	++	+	-
Starkey 1	+++	+++	+++	++	+	-	-
Starkey 2	+++	+++	+++	+	-	-	-
Starkey 3	+++	+++	+++	++	+	-	-

Zeichenerklärung wie Tab. 2

Tabelle 16: Zinktoleranz der Th. ferrooxidans-Stämme.

Versuchsdauer 40 Tage

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

Zeichenerklärung wie Tab. 11

Tabelle 17: Adaptation von Th. thiooxidans und Th. ferrooxidans an höhere Zinkkonzentrationen.

Th. thiooxidans		Th. ferrooxidans	
Stamm	verträgt maximal gZn/l	Stamm	verträgt maximal gZn/l
Bol 1	25,0	Meg 5	25,0
Elb 10	25,0	Beck	12,5
K ₀	25,0	Bl 6	12,5
Scot	12,5	Bol 3	12,5
Starkey 3	5,0	Elb 4	12,5
Starkey 1	0,5	Fa 5	12,5
Starkey 2	0,5	Scot	5,0
Bol 4	0,25	K 2	0,5
Bol 5	0,05	Ram 2c	0,25

VIII. Versuche zur Frage der mikrobiologischen

Aufarbeitung von Kupfererzen.

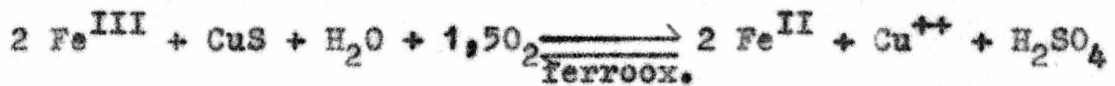
Da *Thiobacillus thiooxidans* und *Th. ferrooxidans* in der Lage sind Kupfer aus sulfidischen Kupfererzen als Sulfat in Lösung zu bringen, ist wiederholt versucht worden, mit Hilfe von Thiobakterien minderwertige Kupfererze und Haldenbestände aufzuarbeiten (BRYNER u.a., 1954, 1957, 1958; DAVIS, 1953; WEED, 1956; WILSON, 1952; ZIMMERLY u.a., 1958). Das in Lösung gegangene Kupfer läßt sich von dem begleitenden Eisensulfat abtrennen.

Wir haben zunächst bei je drei unserer *Th. thiooxidans*- und *Th. ferrooxidans*-Stämme geprüft, ob Kupfer aus frisch gefälltem Kupfersulfid⁺) in Lösung gebracht werden kann. Auf 100 ml STA/S- bzw. LE-Lösung haben wir 500 mg Kupfersulfid (in Reagenzgläsern 3 x 30 min. sterilisiert und der Nährlösung aseptisch zugesetzt) gegeben, mit *thiooxidans* bzw. *ferrooxidans* beimpft und durch wiederholte pH-Messungen die Säuerung des Mediums verfolgt. Nach 14, 50 und 100 Tagen wurden Proben zur Kupferbestimmung entnommen. Die Oxydation des Kupfersulfids zu Kupfersulfat verläuft innerhalb von hundert Tagen in einigen Fällen nahezu quantitativ⁺⁺) (Tab. 18 u. 19). Sie ist bei *ferrooxidans* intensiver als bei *thiooxidans*. *Th. ferrooxidans* arbeitet beim Lösungsvorgang des

⁺) Kupfersulfid wurde durch Einleiten von H_2S in salzsaure Kupfersulfatlösung gewonnen, filtriert, wiederholt mit Aqua dest. gewaschen und bei $90^\circ C$ getrocknet.

⁺⁺) 500 mg CuS enthalten 334 mg Cu , das entspricht 3340γ Cu/ml .

Kupfers aus Sulfid wie ein Katalysator, indem er das bei der Oxydation des Kupfers reduzierte Eisen wieder oxydiert (ZIMMERLY u.a., 1958).



Ein Teil des Kupfersulfids wird auch durch spontane Oxydation in Lösung gebracht (vergl. Sterilkontrolle Tab. 18 u. 19).

Tabelle 18: Oxydation von Kupfersulfid zu Kupfersulfat
durch Thiobacillus thiooxidans.

Zeit in d	Stamm							
	Bi 6		Bing		Bel 3		Sterilkontr.	
	pH	µCu/ml	pH	µCu/ml	pH	µCu/ml	pH	µCu/ml
14	1,89	230	2,12	220	1,98	190	4,50	135
50	1,26	1400	1,71	1100	1,60	1190	4,32	240
100	0,91	1730	0,78	1550	0,63	2100	4,01	570

Tabelle 19: Oxydation von Kupfersulfid zu Kupfersulfat
durch Thiobacillus ferrooxidans.

Zeit in d	Stamm							
	Bi 6		Bing		Bel 3		Sterilkontr.	
	pH	µCu/ml	pH	µCu/ml	pH	µCu/ml	pH	µCu/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

Die Kupferwerte sind Mittelwerte aus 5 Bestimmungen.

BRYNER, BECK und Mitarbeiter haben sich besonders mit Fragen der mikrobiologischen Aufarbeitung sulfidischer Erze beschäftigt. Wir haben für unsere Modell-Versuche in Anlehnung an BRYNER u. JAMESON (1957) einfache Perkolatoren benutzt (Abb. 14).

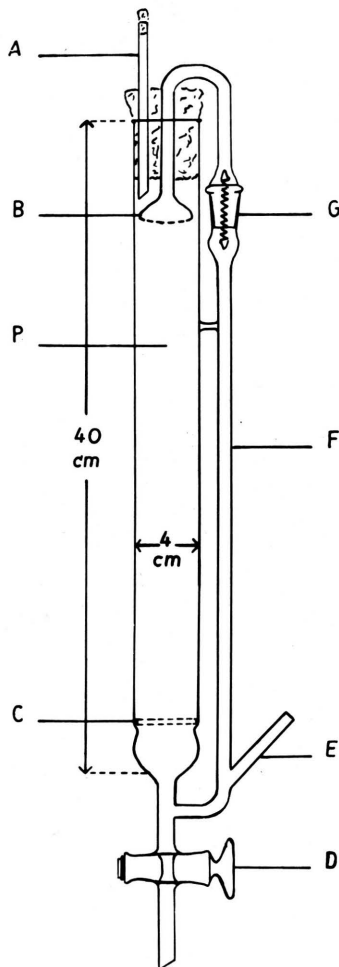


Abb. 14: Längsschnitt eines Perkolators (Zeichenerklärung im Text).

Als Behälter für das zu untersuchende kupferhaltige Material (etwa 400g) diente ein 40cm langes, 4cm weites Glasrohr (P) mit einem perforierten Zwischenboden (C) nahe dem unteren Ende. 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 u. 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. Hier tropft die

Flüssigkeit auf das Untersuchungsmaterial und sickert langsam nach unten. Über den Hahn (D) können Flüssigkeitsproben zur

Untersuchung entnommen werden. A, P und E sind durch Wattefilter verschlossen (bei E nicht eingezeichnet).

Wir haben für unsere Versuche Kupferschiefer bzw. Kupferglanz (Chalkosin) verschiedener Korngröße, rein oder gemischt mit Sand, benutzt. Die gefüllten Perkolatoren wurden im Autoklaven 30 min. bei 1 Atü. sterilisiert und anschließend mit je 50ml einer zehn bis vierzehn Tage alten Th. thiooxidans- und Th. ferrooxidans-Kultur beschickt (Abb.15). Die Perkolatoren waren in Gruppen von drei bis vier Stück an ein Gebläse angeschlossen (Abb. 16).

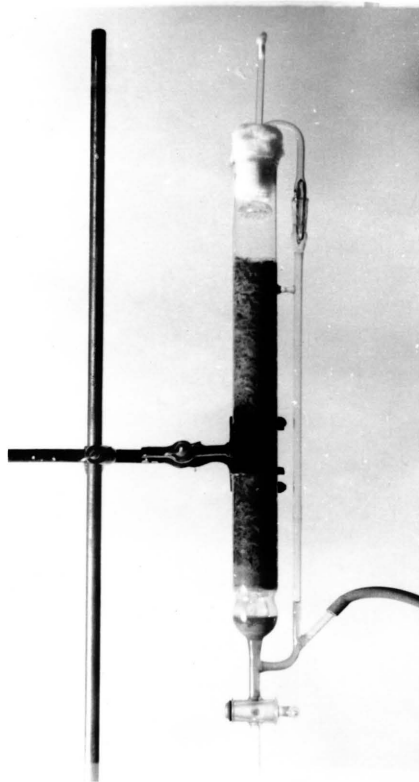


Abb. 15: Perkolator vor Inbetriebnahme.

Wir haben wöchentlich je Gerät eine Probe von 20 ml für pH-Messungen und Kupferanalysen entnommen. In den ersten Versuchsreihen mit Kupferglanz und Sand (1:20) stieg der

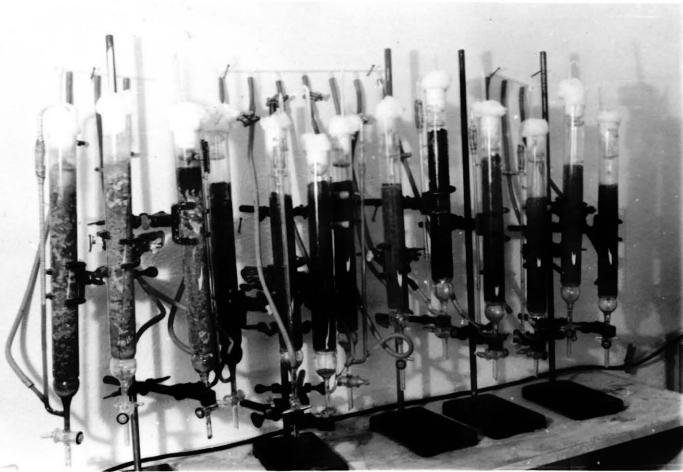


Abb. 16: Perkolatoren-Batterie.

pH-Wert im Laufe der Zeit beträchtlich (nach 35 Tagen pH 6) weil der Karbonatgehalt des Sandes neutralisierend wirkt.

Die Untersuchungsergebnisse der Perkolator-Versuche mit Kupferglanz (Tab. 20) decken sich im wesentlichen mit den Ergebnissen von BRYNER u.a. (1954). BRYNER verwendete als Sterilkontrolle LE-Lösung (pH etwa 3,8). Wir benutzten jedoch hitzesterilisierte, filtrierte Bakterienkulturen, die also schon beträchtliche Fe^{III} - und Säure-Mengen enthielten (im Durchschnitt pH 2,0). Deshalb sind in unseren Untersuchungen die Unterschiede im Kupfergehalt zwischen Sterilkontrolle und bakterienführenden Geräten nicht so groß wie bei BRYNER. Die Wirkung des Sterilfiltrates 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.

BRYNER hat im Unterschied zu unseren Untersuchungen die gefüllten Geräte vor Versuchsbeginn vier Wochen lang mit steriler Nährlösung stehen gelassen, um alles lösliche Kupfer zu entfernen.

Tabelle 20: Verhalten von Kupferglanz in Perkolatoren.

(Beschickung je Gerät: 400 g karbonatfreier Sand + 20 g Cu_2S , Korngröße 0,25 bis 0,6 mm)

Bakterienkultur:	B16		B16		Sterilfiltr. B16	
Laufzeit in d	pH	$\gamma\text{Cu/ml}$	pH	$\gamma\text{Cu/ml}$	pH	$\gamma\text{Cu/ml}$
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

Im Falle des Kupferschiefers wählten wir eine andere Korngröße (1 bis 5mm), da aus Vorversuchen bekannt war, daß das Material bei Säurebehandlung leicht korrodiert und unter Umständen zur Verschlämzung der Perkolatoren führen kann. Kupferschiefer enthält nach PETRASCHECK (1950) im Durchschnitt:

- 50% Quarz und Serizit
- 10% Bitumen
- 10% Sulfide
- 20% Calciumcarbonat bzw. Dolomit

Tabelle 21: Verhalten von Kupferschiefer in Perkolatoren.

Perkolator Nr.	1		2		3	
Beschickung	400g Kupfersch.		400g Kupfersch.		100g Kupfersch. 300g Sand	
Bakterienkult.	Bi 6		Bi 6		Bi 6	
Laufzeit in Tg.	pH	Cu/ml	pH	Cu/ml	pH	Cu/ml
1	5,00	-	4,70	-	4,22	-
7	5,19	0,058 ⁺⁾	5,50	0,46 ⁺⁾	5,00	0,5 ⁺⁾
14	5,21	-	5,30	-	5,00	-
21	5,65	0,5	5,45	0,5	5,72	-
28	4,70	1,0	6,10	0,5	5,80	0,098
42	5,80	0,5	4,85	1,0	7,02	0,5
56	5,43	1,2	7,05	2,0	5,93	1,0
70	5,10	2,0	6,80	2,5	6,53	0,5
98	5,47	1,5	6,20	2,0	5,50	1,2
126	6,10	2,0	6,20	2,0	6,75	2,0

+) Diese Ergebnisse wurden im Institut für Anorganische Chemie ermittelt.

Tabelle 21: Verhalten von Kupferschiefer in Perkolatoren.

Perkolator Nr.	1		2		3		4		5		6	
Beschickung	400g Kupfersch.		400g Kupfersch.		100g Kupfersch. 300g Sand		400g Kupfersch.		400g Kupfersch.		100g Kupfersch. 300g Sand	
Bakterienkult.	B1 6		B1 6		B1 6		Sterilfiltr. B16		Beck		Beck	
Laufzeit in Tg.	pH	Cu/ml	pH	Cu/ml	pH	Cu/ml	pH	Cu/ml	pH	Cu/ml	pH	Cu/ml
1	5,00	-	4,70	-	4,22	0,5 ^{+))}	4,02	-	3,92	-	5,50	-
7	5,19	0,058 ^{+))}	5,50	0,46 ^{+))}	5,00	0,5 ^{+))}	4,22	0,074 ^{+))}	4,20	0,058 ^{+))}	7,18	0,058 ^{+))}
14	5,21	-	5,30	-	5,00	-	5,65	-	4,44	-	6,20	-
21	5,65	0,5	5,45	0,5	5,72	-	6,30	0,5	4,30	0,078 ^{+))}	5,10	0,065 ^{+))}
28	4,70	1,0	6,10	0,5	5,80	0,098 ^{+))}	5,80	1,2	4,80	-	6,05	-
42	5,80	0,5	4,85	1,0	7,02	0,5	4,90	1,0	4,95	1,0	5,80	0,5
56	5,43	1,2	7,05	2,0	5,93	1,0	6,10	2,0	5,20	2,0	4,90	1,5
70	5,10	2,0	6,80	2,5	6,53	0,5	5,55	1,2	4,90	2,0	6,10	2,5
98	5,47	1,5	6,20	2,0	5,50	1,2	6,20	1,8	6,05	2,5	5,95	2,5
126	6,10	2,0	6,20	2,0	6,75	2,0	5,90	1,5	5,90	2,5	6,05	2,5

+) Diese Ergebnisse wurden im Institut für Anorganische Chemie ermittelt.

latoeren.

3		4		5		6	
100g Kupfersch. 300g Sand		400g Kupfersch.		400g Kupfersch.		100g Kupfersch. 300g Sand	
Bl 6		Sterilfiltr. Bl 6		Beck		Beck	
pH	Cu/ml	pH	Cu/ml	pH	Cu/ml	pH	Cu/ml
4,22	8	4,02	-	3,92	-	5,50	-
5,00	0,5 ⁺)	4,22	0,074 ⁺)	4,20	0,058 ⁺)	7,18	0,058 ⁺)
5,00	-	5,65	-	4,44	-	6,20	-
5,72	-	6,30	0,5	4,30	0,078 ⁺)	5,10	0,065 ⁺)
5,80	0,098 ⁺)	5,80	1,2	4,80	-	6,05	-
7,02	0,5	4,90	1,0	4,95	1,0	5,80	0,5
5,93	1,0	6,10	2,0	5,20	2,0	4,90	1,5
6,53	0,5	5,55	1,2	4,90	2,0	6,10	2,5
5,50	1,2	6,20	1,8	6,05	2,5	5,95	2,5
6,75	2,0	5,90	1,5	5,90	2,5	6,05	2,5

ische Chemie

Der hohe Karbonatgehalt des Kupferschiefers ist bemerkenswert. In Versuchen mit *Th. thiooxidans*- und *ferrooxidans*-Stämmen wirkt er sich ähnlich aus wie karbonathaltiger Sand im Gemisch mit Kupferglanz. Die zirkulierende Lösung gelangt nicht in den Bereich der für das Wachstum optimalen pH-Werte. Die Menge des in Lösung gehenden Kupfers bleibt daher gering (Tab. 21). Mit zunehmenden pH-Werten kann sogar in Lösung gegangenes Kupfer als Kupferhydroxyd ausfallen bzw. adsorptiv an das Gestein gebunden werden (vergl. Tab. 21, Perkolator Nr. 3).

Es bleibt abzuwarten, wie sich kalkarme Partien des Kupferschiefers verhalten. Zu erwägen wäre ferner, den optimalen H-Ionenbereich der Thiobakterienstämme durch Adaptationsversuche und Auslese von Mutanten zu verlagern, wenn nicht grundsätzlich mit dem Verlauf des Oxydationsvorganges zusammenhängende Prozesse diesen Versuchen entgegenstehen.

IX. Diskussion.

Die Biocoenose der schwefelsauren Grubenwässer ist gekennzeichnet durch das Vorkommen der beiden Thiobakterien-Arten *Thiobacillus thiooxidans* und *Th. ferrooxidans*, die an fast allen Standorten von säuretoleranten Pilzen begleitet waren. Die Pilze selbst sind nicht an der für die beiden Thiobakterien charakteristischen Säurebildung beteiligt. In der Mehrzahl der Fälle scheinen keine engeren Beziehungen zwischen Bakterien und Pilzen zu bestehen. In einzelnen Fällen werden Säurebildung und damit wohl auch die Vermehrung der Bakterien durch Pilze beschleunigt oder verzögert. Fördernd wirken vor allem zwei *Rhodotorula*-Arten bei beiden Thiobakterien-Arten und *Pullularia pullulans* bei *Th. thiooxidans*. Anfälliger gegenüber hemmenden Einflüssen ist *Th. ferrooxidans*, bei dem vor allem durch *Spi-caria divaricata* und *Penicillium waksmani* die Säurebildung in der zweigliedrigen Mischkultur um zwei bis zehn Tage verzögert wird.

In geomikrobiologischer Beziehung verdient das Vorkommen der beiden Thiobakterien Beachtung. Ähnlich den Desulfurizierern sind sie offensichtlich weit auf der Erde verbreitet und wohl als Kosmopoliten anzusehen. Ihre Entwicklung in Verbindung mit dem Vorkommen sulfidischer Erze, besonders Pyrit und Markasit, ist an das Vorhandensein von ausreichend Feuchtigkeit und Luft gebunden. Im trocknen Mansfelder Kupferschiefer haben wir keine Thiobakterien

gefunden. In nassen Oxydationszonen, z.B. im Rammelsberg bei Goslar und in der Grube Einheit bei Elbingerode sind sie in erheblichen Mengen vorhanden. Ihre Ernährungsansprüche sind gering. Sie sind im großen ganzen, soweit es bis jetzt bekannt ist, auxoautotroph; sie verwerten in einem vorwiegend aeroben Stoffwechsel CO_2 und decken ihren Stickstoffbedarf aus kleinen Mengen von anorganischen Stickstoffverbindungen, besonders von NH_4 -Salzen. In Bezug auf ihr Verhalten zum Sauerstoff und auf ihre Stellung im Schwefelkreislauf sind sie Antagonisten zu den Desulfurizierern. Die Annahme scheint gerechtfertigt, daß sie an den teilweise recht komplizierten sekundären Umsetzungen in sulfidischen Lagerstätten beteiligt sind, an der Mobilisierung und Wanderung der Schwermetalle, Prozesse die im einzelnen in Verbindung mit einer erneuten Reduktion und Fällung der Schwermetallsulfate durch Desulfurikation noch untersucht werden müssen.

Da durch saure Grubenwässer erhebliche Korrosionsschäden verursacht werden, besteht ein großes wirtschaftliches Interesse daran, die Tätigkeit der Thiobakterien von denen die Säurebildung gegenüber der chemischen Oxydation der Sulfide zum mindesten erheblich beschleunigt wird (LEATHEN u. BRALBY, 1951) auszuschalten. Auf die Schwierigkeiten eines solchen Vorgehens haben TEMPLE u. KOEHLER (1954) ausführlich hingewiesen. Auch von den begleitenden Pilzen ist in dieser Hinsicht kaum etwas zu erwarten. Abschluß der Luft aus abgebauten, verlassenen Strecken,

Kontrolle der Wasserbewegung und getrennte Ableitung der infizierten stark sauren Wasser scheinen zur Zeit die einzigen Hilfsmittel zu sein.

In Bezug auf die Schwermetall-Toleranz und das Adaptationsvermögen, die sich beide nicht nur auf Eisen und Kupfer erstrecken, bestehen Unterschiede zwischen Th. thiooxidans und Th. ferrooxidans und zwischen Stämmen verschiedener Herkunft.

Die Versuche, Kupfer - soweit es sich um Sulfide handelt - aus kupferhaltigen Haldenrückständen und aus armen, für die Verhüttung ungeeigneten Erzen, mit Hilfe von Thiobakterien zu mobilisieren, scheinen dagegen Erfolg zu versprechen. Aus dem abfließenden Wasser, das je nach dem Charakter der Lagerstätte ein Gemisch von Schwermetallsulfaten enthält, läßt sich Kupfer abscheiden (ZIMMERLY u.a. 1958). Voraussetzung ist allerdings, daß der normale Verlauf der Säurebildung, die mit der Entwicklung der Thiobakterien verbunden ist, nicht gestört wird.

X. Zusammenfassung.

1. In 50 Proben saurer Grubenwässer von 15 verschiedenen Standorten (Braunkohlen-Tagebauen und Lagerstätten sulfidischer Erze) konnten Thiobakterien nachgewiesen werden.
2. Insgesamt wurden 12 Stämme von *Thiobacillus thiooxidans* und 9 von *Th. ferrooxidans* in Reinkultur gezogen. Sie unterscheiden sich innerhalb einer Art besonders in Bezug auf Intensität der Säurebildung, in den Temperaturansprüchen und in der Schwermetall-Toleranz.
3. Alle 12 *Th. thiooxidans*-Stämme können sowohl NO_3 als auch NH_4 verwerten. Wir halten deshalb die Trennung in die Arten *Th. thiooxidans* und *Th. conoerativorus* (nur dieser soll, als wesentliches unterscheidendes Merkmal, NO_3 verwerten können) nicht für gerechtfertigt. Desgleichen sehen wir in der Aufstellung der Gattung *Ferrobacillus* durch LEATHEN u. BRALEY (1954) eine zu weitgehende Bewertung eines einzelnen physiologischen Merkmals, bei Übereinstimmung in den sonstigen wesentlichen Eigenschaften.
4. In 48 Proben waren die Thiobakterien von Pilzen (in a.T. Uppiger Entwicklung) begleitet. Am häufigsten traten neben *Pullularia pullulans* zwei *Rhodotorula*-Arten auf.
5. Die Pilze sind säuretolerant, jedoch nicht an der Oxydation der Sulfide beteiligt. Der Einfluß auf die Entwicklung der Bakterien ist gering.

6. Th. thiooxidans und Th. ferrooxidans sind durch hohe Schwermetalltoleranz (Eisen, Kupfer und Zink wurden geprüft) ausgezeichnet, die sich bei den bisher untersuchten Stämmen durch Adaptation steigern läßt. Hierbei treten zwischen den einzelnen Stämmen Unterschiede auf, die zu dem jeweiligen Standort in Beziehung stehen.
7. In Modellversuchen mit Kupferglanz läßt sich in Bestätigung der Versuche von BRYNER und Mitarbeitern nachweisen, daß Schwermetalle aus den Sulfiden mobilisiert und durch die zirkulierende Flüssigkeit weggeführt werden; ein Vorgang, der dem "leaching process" zur Verwertung von minderwertigen sulfidischen Kupfererzen und kupferhaltigen Haldenbeständen zugrunde liegt und wahrscheinlich bei sekundären Umsetzungen in Lagerstätten sulfidischer Erze beteiligt ist.
8. Bei der Anwendung des "leaching process" auf Mansfelder Kupferschiefer treten Störungen auf, die mit dem Kohlenstoffgehalt des Kupferschiefers zusammenhängen.

Literaturverzeichnis

- ALLISON, R. V. A preliminary note on the effect of the nitrate radical upon biological oxidation of inorganic sulfur.
N.J. Agr. Exp. Sta. Rept. 1922, 366-369
- ASHMEAD, D. The influence of bacteria in the formation of acid mine waters.
Colliery Guard. 2, 694-698, 1955
- BARNETT, H. L. Illustrated Genera of Imperfect Fungi.
Burgess Publishing Co., Minneapolis, 1954
- BAUDISCH, C. Über ein neues Schwefelbakterium aus den Thermen von Santa Rosalia.
Svensk. Kem. Tidskr. 47, 191-204, 1935
- BECK, J. V. u. ELSDEN, H. Isolation and some characteristics of an iron-oxidizing bacterium.
J. Gen. Microb. 19, 1 223-228, 1958
- BOAS, F. u. BAUER, R. Über das Wachstoffsbedürfnis v. *Dematium*.
Protoplasma 27, 106-113, 1937
- BREED, R. S., MURRAY, E. G. D. u. SMITH, N. R. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology.
Williams u. Wilkins Co. Baltimore, 1957
- BRYNER, L. C., BECK, J. V. u. DAVIS, D. B. u. WILSON, D. G. Microorganisms in leaching sulfide minerals.
Ind. Eng. Chem. 46, 2587-2592, 1954
- BRYNER, L. C. u. ANDERSON, R. Microorganisms in leaching sulfide minerals.
Ind. Eng. Chem. 49, 1721-1724, 1957
- BRYNER, L. C. u. JAMESON, A. K. Microorganisms in leaching sulfide minerals.
Appl. Microb. 6, 4 281-287, 1958
- CALLAN, TH. u. HENDERSON, R. A new reagent for the colorimetric determination of minute amounts of copper.
Analyst 54, 650-653, 1929
- CARPENTER, C. u. DAVIDSON, A. Developments in the treatment of acid mine drainage.
Proc. W. Va. Acad. Sci. 4, 93-99, 1930
- CHARLET, E. u. SCHWARTZ, W. Untersuchungen über die Lebensweise von *Leptothrix ochracea* und einigen begleitenden Eisenmikroben.
Schweiz. Ztschr. f. Hydrologie 16, 2 318-341, 1954

- COLMER, A. R. u. HINKLE, M. E. The role of microorganisms in acid mine drainage.
Science 106, 253-256, 1947
- COLMER, A. R., TEMPLE, K. L.
u. HINKLE, M. E. An iron-oxidizing bacterium from the acid drainage of some bituminous coal mines.
J. Bact. 59, 3 317-328, 1950
- DAVIS, D. B. Biological oxidation of copper sulfide minerals.
Masters thesis, Bingham Young University, 1953
- EMOTO, Y. Über eine neue schwefeloxydierende Bakterie.
Botan. Mg. Tokyo 42, 421-426, 1928
- EMOTO, Y. Über drei neue Arten der schwefeloxydierenden Bakterien.
Proc. Imp. Acad. 5, 148-151, 1929
- FJERDINGSTAD, E. Bacteriological investigations of mine water from lignite pits in Denmark.
Schweiz. Ztschr. f. Hyg. 18, 2, 1956
- FRANTZ, J. D., FREIGELMANN, H. Biosynthesis of seventeen amino acids labeled with C¹⁴
WERNER, S. A. u. SMYTHE, M. P. J. Biol. Chem. 195, 423-428, 1952
- GILMAN, J. C. A MANUAL of Soil Fungi.
The Iowa State College Press-Ames, Iowa, U. S. A., 1957
- LEATHEN, W. W.
u. MADISON, K. M. The oxidation of ferrous iron by bacteria found in acid mine waters.
Bact. Proc. 64, 15, 1949
- LEATHEN, W. W.
MC INTYRE, L. D.
u. BRALEY, S. A. A medium for the study of bacterial oxidation of ferrous iron.
Science 114, 280-281, 1951
- LEATHEN, W. W.
MC INTYRE, L. D.
u. BRALEY, S. A. A study of acid formation by iron oxidizing bacteria found in bituminous coal mine drainage.
Bact. Proc. 67, 15, 1952
- LEATHEN, W. W.
BRALEY, S. A.
u. MC INTYRE, L. D. The role of bacteria in the formation of acid from certain sulfuric constituents associated with bituminous coal. I. *Thiobacillus thiooxidans*.
Appl. Microb. 1, 2 61-64, 1953

- LEATHEN, W.W.
BRALEY, S.A.
MC INTYRE, L.D. The role of bacteria in the formation of acid from certain sulfuric constituents associated with bituminous coal. II. Ferrous iron oxidizing bacteria. *Appl. Microb.* 1, 2 65-68, 1953
- LEATHEN, W.W.
u. BRALEY, S.A. A new iron-oxidizing bacterium: *Ferrobacillus ferrooxidans*. *Bact. Proc.* 44, 1955
- LEATHEN, W.W.
KINSEL, N.A.
u. BRALEY, S.A. A solid medium for the study of *Ferrobacillus ferrooxidans*. *Bact. Proc.* 46, 1955
- LEATHEN, W.W.
KINSEL, N.A.
u. BRALEY, S.A. *Ferrobacillus ferrooxidans*: A chemosynthetic autotrophic bacterium. *J. Bact.* 72, 5 700-704, 1956
- LIPMAN, J.G.
WAKSMAN, S.A.
u. JOFFE, J.S. The oxidation of sulfur by soil microorganisms. *Soil Sci.* 12, 475-489, 1921
- LODDER, J.
u. KREGER VAN RIJ The Yeasts
North-Holland Publishing Co.
Amsterdam, 1952
- MC FARLANE, W.D. Application of the sodium diethyldithiocarbamate reaction to the microcolorimetric determination of copper in organic substances. *Biochem. J.* 26, 1022-1033, 1932
- O'KANE, D.J. The presence of growth factors in the cells of autotrophic sulfur bacteria. *J. Bact.* 43, 7 (abstract) 1942
- PARKER, C.D. The corrosion of concrete.
1. The isolation of a species of bacterium associated with the corrosion of concrete exposed to atmospheres containing hydrogen sulphide. *Austr. Jour. Exper. Biol. and Med. Sci.* 23, 81-90, 1945
- PETRASCHECK, W.
u. PETRASCHECK, W. E. Lagerstättenkunde
Springer-Verlag, Wien, 1950
- QUISPEL, A.
HARMSSEN, G.W.
u. OTZEN, D. Contribution to the chemical and biological oxidation of pyrite in soil. *Plant a. Soil* 4, 43-55, 1953
- RAPER, K. B. u. THOM, C. A Manual of the Penicillia.
Williams a. Wilkins Co. Baltimore, 1949

- SCHARRER, K. u. KÜHN, H. Die Dithizon-Mischfarbenmethode und ihre Anwendung bei der Bestimmung kleinster Mengen Kupfer in Böden und biochemischen Substanzen.
Bodenk. u. Pflanzenern. 21/22 (66/67)
344-364, 1940
- SILVERMAN, M. P.
u. LUNDGREN, D. Studies on the chemotrophic iron bacterium *Ferrobacillus ferrooxidans*.
I. An improved medium and a harvesting procedure for securing high cell yields.
- SMITH, C. L.
u. MC CURDY, W. H. 2,9-Dimethyl-1,10-phenanthroline
New specific in spectrophotometric determination of copper.
Analytical Chemistry 24, 371-373, 1952
- STARKEY, R. L. Concerning the physiology of *Thiobacillus thiooxidans* an autotrophic bacterium oxidizing sulfur under acid conditions.
J. Bact. 10, 135-163, 1925
- STARKEY, R. L. Concerning the carbon and nitrogen nutrition of *Thiobacillus thiooxidans*, an autotrophic bacterium oxidizing sulfur under acid conditions.
J. Bact. 10, 165-195, 1925
- STARKEY, R. L.
u. WIGHT, K. M. Anaerobic corrosion of iron in soil.
American Gas Association, New York, 1945
- TEMPLE, K. L.
u. COLMER, A. R. The formation of acid mine drainage.
Min. Eng. 2, 12 1090-1092, 1951
- TEMPLE, K. L.
u. COLMER, A. R. The autotrophic oxidation of iron by a new bacterium: *Thiobacillus ferrooxidans*.
J. Bact. 62, 5 605-611, 1951
- TEMPLE, K. L.
u. KOEHLER, W. A. Drainage from bituminous coal mines.
West Virginia University Bull.
Series 54, 4 1-35, 1954
- THOM, C. u. RAPER, K. B. A Manual of the Aspergilli.
Williams & Wilkins Co. Baltimore, 1945
- THUN, R., HERMAN, R.
u. KNICKMANN, E. Die Untersuchung von Böden.
Methodenbuch Bd. 1
Neumann Verlag, Radebeul u. Berlin, 1955
- WAKSMAN, S. A.
u. JOFFE, J. S. Microorganisms concerned in the oxidation of sulfur in the soil.
II. *Thiobacillus thiooxidans*, a new sulfur-oxidizing organism.
J. Bact. 7 (31) 239-256, 1922

- WEED, R.C. Cananean program for leaching in place.
Mining. Eng. 8, 721-723, 1956
- WILSON, D.G. Studies on the biological oxidation of
iron pyrites.
Masters thesis, Bingham Young Univ., 1952
- ZIMMERLY, S.R. How bacteria leach low-grade ores.
- WILSON, D.G. u. PRATER, J.P. Eng. and Mining, J. 159, 6 89-91, 1958