

Abschlussbericht  
der durch die Max-Buchner-Forschungstiftung geförderten  
Forschungsarbeit

# **Bakterielle Diversität in einer Wasserbehandlungsanlage zur Reinigung saurer Grubenwässer**

Kennziffer 2721

Förderzeitraum 01.07.2007 - 30.06.2008

## Abstract

In Versuchsanlagen zur Reinigung von sauren Bergbauwässern durch mikrobielle Eisenoxidation wurde die Zusammensetzung und Stabilität der mikrobiellen Lebensgemeinschaft durch molekulargenetische Analysemethoden untersucht. Die mikrobielle Lebensgemeinschaft in den Versuchsanlagen wurde von „*Ferrovum myxofaciens*“ und von *Gallionella* verwandten Bakterien dominiert.

## Stipendiat

**Elke Heinzl**

## Antragssteller

**Prof. Dr. Michael Schlömann**

TU Bergakademie Freiberg  
Interdisziplinäres Ökologisches Zentrum  
Leipziger Straße 29  
09599 Freiberg

## **1. Einleitung**

Stark eisenhaltige und saure Bergbauwässer aus Tagebaulandschaften bedingen einen erheblichen Sanierungsaufwand. Die konventionelle Reinigung dieser Wässer findet durch pH-Wertanhebung und Fällung mit Kalk ( $\text{Ca(OH)}_2$ ) statt (1). Bei dieser Behandlungsmethode werden erhebliche Kalkmengen benötigt und es entstehen große Mengen schlecht entwässerbarer Eisenhydroxidschlämme für die es keine industrielle Verwendung gibt.

Eine alternative Möglichkeit zu dieser Wasserbehandlungsmethode stellt die Einbeziehung einer vorgeschalteten biologischen Oxidationsstufe dar (2). Dabei werden im sauren pH-Bereich Eisenhydroxysulfate ausgefällt, was zu einer Verringerung der Eisenfracht in die chemische Behandlungsstufe führt. Diese Eisenhydroxysulfate besitzen für eine Abtrennung und Weiterverarbeitung weitaus günstigere chemische Eigenschaften als die Eisenhydroxide und können zum Beispiel als Grundstoff für Farbpigmente genutzt werden. Für das Erreichen möglichst kurzer Verweilzeiten und damit hoher Durchflussraten ist die Analyse der mikrobiellen Lebensgemeinschaft von großem Interesse, um Informationen über die mikrobiellen Prozessträger und die Stabilität des Systems zu gewinnen.

Im Rahmen eines BMBF-geförderten Verbundprojektes mit dem Thema „Umweltfreundliche biotechnologische Gewinnung von Eisenhydroxysulfaten aus der Bergbauwasserbehandlung und deren Verwertung als Roh- und Grundstoff in der keramischen, Baustoffe produzierenden sowie Farben und Pigmente herstellenden Industrie zur Kosten-, Rohstoff- und Ressourceneinsparung“ wurden zwei Pilotanlagen zur Wasserbehandlung durch biologische Eisenoxidation im Tagebau Nochten mittels molekulargenetischer Methoden untersucht.

## **2. Experimentelles Vorgehen und erzielte Ergebnisse**

### **2.1 Untersuchung der Zusammensetzung der mikrobiellen Lebensgemeinschaft in der Versuchsanlage**

Nach In-Betriebnahme der ersten Pilotanlage wurden Wasser- und Feststoffproben vom Bereich des Zuflusses (Abbildung 1; Probenahmepunkt 1) und der Mitte des Oxidationsbeckens (Abbildung 1; Probenahmepunkt 2) entnommen und die Zusammensetzung der mikrobiellen Lebensgemeinschaft durch die Analyse von 16S rDNA Klonbanken untersucht.

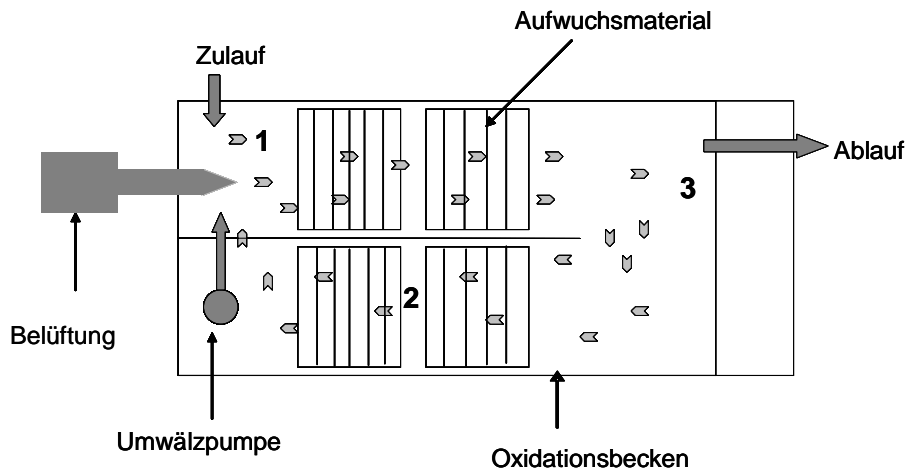


Abbildung 1: Prinzipschema beider Versuchsanlagen zu biologischer Eisenoxidation

Zusätzlich wurde die mikrobielle Diversität im Kippengrundwasser, das in die Versuchsanlage gepumpt wurde, untersucht. Die Verteilung der phylogenetischen Gruppen in den untersuchten Klonbanken ist in Tabelle 1 dargestellt.

In den 16S rDNA Klonbanken der Wasser- und Feststoffproben aus der Wasserbehandlungsanlage bildete die Klasse der *Betaproteobacteria* die größte Sequenzgruppe. Die meisten Sequenzen dieser phylogenetischen Klasse waren verwandt zu „*Ferrovum myxofaciens*“. Diese Art wurde vor kurzem aus saurem Wasser einer still gelegten Kupfermine isoliert und ist bisher noch nicht formell beschrieben. Über physiologische Eigenschaften von „*F. myxofaciens*“ sind derzeit nur wenige Informationen verfügbar. Es ist jedoch bekannt, dass diese Art nur zweiwertiges Eisen als Elektronendonator nutzen kann, obligat autotroph lebt und weniger Säure-tolerant zu sein scheint als die bekannten Eisenoxidierer *Acidithiobacillus ferrooxidans* und *Leptospirillum ferrooxidans* (3).

Eine weitere bedeutende phylogenetische Gruppe in der mikrobiellen Lebensgemeinschaft der Wasserbehandlungsanlage, speziell in den Feststoffproben, bildete die Klasse der *Alphaproteobacteria*. Die meisten dieser Klone waren verwandt zu heterotrophen *Acidocella*, *Acidiphilium* und *Sphingomonas* Spezies. Die Funktion dieser heterotrophen Bakterien in Eisen oxidierenden Lebensgemeinschaften ist derzeit noch nicht vollständig geklärt. Die Anwesenheit von *Acidocella* und *Acidiphilium* in sauren Bergbauwässern ist jedoch sehr charakteristisch und wurde bereits in vielen Untersuchungsgebieten festgestellt (4, 5). In den Klonbanken der Feststoffproben bildeten Vertreter der *Gammaproteobacteria* und der *Actinobacteria* weitere bedeutende phylogenetische Gruppen, in den

Wasserproben wurden zusätzlich zahlreiche Vertreter der *Deltaproteobacteria* und *Firmicutes* gefunden.

In der Klonbank der Kippengrundwasserprobe besaßen zahlreiche Sequenzen keine Ähnlichkeit zu kultivierten Verwandten. Die meisten Sequenzen konnten in die Klassen der *Actinobacteria* und der *Gammaproteobacteria* eingeordnet werden. Die offensichtliche Dominanz der *Alpha*- und *Betaproteobacteria* in den Klonbanken der Pilotanlage wurde im Kippengrundwasser nicht nachgewiesen.

Die mikrobielle Lebensgemeinschaft wurde weiterhin durch eine statistische Auswertung der Verteilung der verschiedenen phylogenetischen Gruppen in den Wasser- und Feststoffproben der unterschiedlichen Probenahmepunkte charakterisiert. Die Berechnung der Ähnlichkeitsindizes von Jaccard und Sorensen ergab, dass die Klonbanken der Feststoff- und Wasserproben von einem Probenahmepunkt in der Anlage eine unerwartet geringe Ähnlichkeit aufwiesen, obwohl im Hinblick auf den pH Wert sehr ähnliche Lebensraumbedingungen vorlagen. Die Klonbanken vom Kippengrundwasser und vom Zuflussbereich der Anlage zeigten trotz der unterschiedlichen Lebensraumbedingungen eine signifikant höhere Ähnlichkeit. Es konnte somit zwischen einer anhaftenden und einer frei lebenden Lebensgemeinschaft in der Wasserbehandlungsanlage unterschieden werden.

Tabelle 1: Verteilung der phylogenetischen Gruppen in den Klonbanken der Wasser- und Feststoffproben

Phylum /Klasse	Relative Häufigkeit der Klone in den Klonbanken (%)				
	Feststoffproben		Wasserproben		Kippengrundwasser
	Zufluss	Oxidationsbecken	Zufluss	Oxidationsbecken	
<i>Betaproteobacteria</i>	32	68	31	37	1
<i>Alphaproteobacteria</i>	52	18,5	17	12	1
<i>Gammaproteobacteria</i>	14	5,5	4	8	16
<i>Deltaproteobacteria</i>	0,5	0	13	13	11
<i>Actinobacteria</i>	0,8	5,5	7	7	23
<i>Nitrospira</i>	0,2	0	3	0	0
<i>Verrucomicrobia</i>	0	1,5	3	2	6
<i>Chloroflexi</i>	0	0,5	1	0	6
<i>Firmicutes</i>	0	0,5	14	13	3
<i>Acidobacteria</i>	0	0	7	8	6
<i>Chlorobi</i>	0	0	0	0	13
Andere und nicht Zuordenbare	0.5	0	0	0	14
Gesamtzahl der Klone	304	297	150	150	145

## 2.2 Untersuchungen zur Stabilität der mikrobiellen Lebensgemeinschaft in der Versuchsanlage

Für eine Anwendung der innovativen Grubenwasserbehandlungsmethode im industriellen Maßstab, ist es notwendig, dass jahreszeitliche Temperaturunterschiede und unumgängliche Schwankungen von verschiedenen Betriebsparametern, wie Durchflusszeit, pH-Wert und Eisenkonzentration, nicht zum Zusammenbruch des mikrobiellen Eisenoxidationsprozesses führen.

Für Untersuchungen zur Stabilität der Eisen oxidierenden, mikrobiellen Lebensgemeinschaft in Abhängigkeit von diesen Parametern standen zwei Versuchsanlagen zur Verfügung, die sich vor allem in der Größe des Oxidationsbeckens und der Zusammensetzung des einfließenden Grubenwassers unterschieden. Die erste Versuchsanlage, aus der die Proben für die beschriebenen Klonbankuntersuchungen stammten, besaß ein Oxidationsbecken mit einer Kapazität von ca. 20 m<sup>3</sup> und war durch eine relativ konstante Zusammensetzung des einfließenden Grubenwassers charakterisiert. Die zweite Versuchsanlage mit einer Kapazität des Oxidationsbeckens von 10 m<sup>3</sup> wurde mit Grubenwasser befüllt, das einen größeren Schwankungsbereich der chemischen Parameter aufwies (Tabelle 2).

Tabelle 2: Chemische Parameter der Zuflüsse in die zwei Versuchsanlagen

Parameter	Zufluss in erste Anlage	Zufluss in zweite Anlage
Fe <sup>2+</sup> (mg/L)	480-570	290-420
Sulfat (mg/L)	1900-2700	700-2670
pH	4,6-5,5	2,9-5,8

Über einen Zeitraum von 11 Monaten wurden Wasserproben aus der ersten Versuchsanlage vom Bereich des Zuflusses, der Mitte des Oxidationsbeckens und dem Bereich des Abflusses entnommen (Abbildung 1, Probenahmepunkte 1 bis 3). Im Anschluss daran wurden über einen Zeitraum von 15 Monaten Wasserproben aus der zweiten Versuchsanlage von den entsprechenden Probenahmepunkten entnommen. Die Zusammensetzung der mikrobiellen Lebensgemeinschaft wurde in diesen Proben mit der Fingerprinttechnik T-RFLP (Terminaler Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus) untersucht.

Die Untersuchungen bestätigten die dominierende Rolle, der „*Ferrovum myxofaciens*“ verwandten Bakterien in der Eisen oxidierenden Lebensgemeinschaft. Darüber hinaus ergaben die Untersuchungen, dass eine weitere Gruppe der *Betaproteobacteria* eine dominierende Rolle in der mikrobiellen Lebensgemeinschaft spielte. Diese Bakterien waren verwandt mit *Gallionella ferruginea*, einem Stiel bildendem Bakterium dessen Lebensraum eng auf microaerophile, schwach saure Bedingungen begrenzt ist (6, 7). *Gallionella ferruginea* verwandte Bakterien wurden bei der vorangegangenen Klonbankanalyse nur mit einer sehr geringen Häufigkeit detektiert. In den darauf folgenden Stabilitätsuntersuchungen dominierten die *Gallionella* und „*Ferrovum*“ verwandten Bakterien die mikrobielle Lebensgemeinschaft in beiden Versuchsanlagen. Die *Gallionella*-Verwandten wiesen dabei jeweils in der ersten Versuchsperiode nach In-Betriebnahme der Anlagen unter unstabilen Redoxbedingungen und schwankenden Eisenkonzentrationen die größte Häufigkeit auf. Die „*Ferrovum*“-Verwandten dominierten spätere Versuchsperioden unter konstanteren Bedingungen.

In den Wasserproben von den unterschiedlichen Probenahmepunkten wurden keine Unterschiede in der Zusammensetzung der mikrobiellen Lebensgemeinschaft festgestellt. Jahreszeitliche Temperaturunterschiede zeigten keinen Einfluss auf die Zusammensetzung der mikrobiellen Lebensgemeinschaft. Durch die Messung von Redoxpotential und Eisenkonzentrationen wurde gezeigt, dass die mikrobielle Eisenoxidation auch bei sehr tiefen Wassertemperaturen von ca. 5°C kurz nach In-Betriebnahme der ersten Anlage startete.

Um die Dominanz der *Gallionella*-und der „*Ferrovum*“-Verwandten in der mikrobiellen Lebensgemeinschaft absichern zu können, wurden diese beiden Gruppen in verschiedenen DNA Extrakten zusätzlich mit Real-Time PCR quantifiziert. Dafür wurden zwei spezifische TaqMan Assays entworfen und die optimalen PCR Bedingungen für diese Assays bestimmt. Die Untersuchungen bestätigten die Dominanz dieser beider Gruppen in beiden Versuchsanlagen.

### **3. Schlussfolgerung**

„*Ferrovum myxofaciens*“ und *Gallionella* verwandte Bakterien dominierten die mikrobielle Lebensgemeinschaft in beiden Versuchsanlagen und bildeten eine stabile Gemeinschaft. Bekannte Eisenoxidierer wie *Acidithiobacillus ferrooxidans* und *Leptospirillum ferrooxidans* spielten dagegen keine bedeutende Rolle in den

Versuchsanlagen und wurden nur mit einer sehr geringen Häufigkeit detektiert. In beiden Anlagen wurde trotz unterschiedlicher chemischer Zusammensetzung der Zuflusswässer und unterschiedlicher Größe des Oxidationsbeckens eine sehr ähnliche mikrobielle Lebensgemeinschaft selektiert.

### Veröffentlichungen im Rahmen des geförderten Projektes

- Heinzl, E., Janneck, E., Glombitza, F., Schlömann, M., Seifert, J. Population dynamics of iron oxidizing communities in pilot plants for the treatment of acid mine waters. Eingereicht bei Environmental Science & Technology 2009.
- Heinzl, E., Hedrich, S., Janneck, E., Glombitza, F., Seifert, J., Schlömann, M. Bacterial diversity in a mine water treatment plant. *Appl. Environ. Microbiol.* 2009, 75, doi:10.1128/AEM.1045-1108.
- Heinzl, E., Hedrich, S., Seifert, J., Schlömann, M. Microbial Diversity in a pilot plant for producing iron hydroxysulfates. S. 527-530. In: Schippers, A., Sand, W., Glombitza, F., Wilscher, S. (Hrsg.) Biohydrometallurgy: From the single cell to the environment (IBS) Advanced Materials Research Bd. 20-21. Trans Tech Publications, Stafa-Zürich.

### Referenzen

- (1) Sengupta, M. *Environmental impacts of mining: monitoring, restoration, and control*; Lewis publishers: London, **1993**.
- (2) Glombitza, F.; Janneck, E.; Arnold, I.; Rolland, W.; Uhlmann, W., Eds. *Eisenhydroxysulfate aus der Bergbauwasserbehandlung als Rohstoff*; GDMB Medienverlag: Clausthal-Zellerfeld, 2007; Vol. 110.
- (3) Rowe, O. F.; Johnson, D. B. Comparison of ferric iron generation by different species of acidophilic bacteria immobilized in packed-bed reactors. *Syst. Appl. Microbiol.* **2008**, 31, 68-77.
- (4) Johnson, D. B.; Rolfe, S.; Hallberg, K. B.; Iversen, E. Isolation and phylogenetic characterization of acidophilic microorganisms indigenous to acidic drainage waters at an abandoned Norwegian copper mine. *Environ. Microbiol.* **2001**, 3, 630-637.
- (5) Okabayashi, A.; Wakai, S.; Kanao, T.; Sugio, T.; Kamimura, K. Diversity of 16S ribosomal DNA-defined bacterial population in acid rock drainage from Japanese pyrite mine. *J. Biosci. Bioeng.* **2005**, 100, 644-652.
- (6) Hallbeck, L. E.-L.; Pederson, K. Genus I. *Gallionella* Ehrenberg 1838, 166. In *Bergey's manual of systematic bacteriology*, 2. ed.; Brenner, D. J., Krieg, N. R., Staley, J. T., Eds.; Springer: New York, **2005**; Vol. 2.
- (7) Hanert, H. H. The genus *Gallionella*. In *The Prokaryotes. A handbook in habitats, isolation and identification of bacteria*; Starr, M. P., Trüper, H. G., Balows, A., Schlegel, H. G., Eds.; Springer: Berlin, **1981**.