

# **Bakterielle Laugung von Armerzen und Industrierückständen**

## **EXPERTENGESPRÄCH**

**am 18. Oktober 1984**

veranstaltet von der  
Projektleitung Rohstoffforschung  
Kernforschungsanlage Jülich GmbH

im Auftrag des  
Bundesministers für Forschung und Technologie

Anreicherung, Isolierung und Charakterisierung neuartiger, erzlaugender Bakterien

H. Huber, G. Huber und K.O. Stetter

Lehrstuhl für Mikrobiologie, Universität Regensburg

8400 Regensburg, Universitätsstr. 31

Thiobacillen, insbesondere die Art Thiobacillus ferrooxidans, sind als Metallmobilisierer allgemein bekannt, da sie sehr leicht aus erz- und schwefelhaltigen Standorten angereichert und isoliert werden können. Morphologisch handelt es sich bei den beiden Hauptvertretern der Gattung Thiobacillus, Thiobacillus ferrooxidans und Thiobacillus thiooxidans um relativ plumpe Kurzstäbchen, etwa 0.5 µm dick und 1 µm lang, die oft floßartig mit ihrer Längsseite aneinander liegen (Abb. 1). Zur mikrobiellen Erzlaugung im großtechnischen Maßstab, beispielsweise bei Suspensionslaugung wurden bisher bei Verwendung definierter Kulturen ausschließlich diese beiden Arten eingesetzt (1, 2). Kürzlich wurde Leptospirillum ferrooxidans (3) sowie andere Leptospirillum-artige Organismen aus Erzhalde isoliert (4), die Pyrit laugen und  $\text{Fe}^{2+}$  oxidieren. Außer den mesophilen Thiobacillen wurde in neuerer Zeit auch das coccoide thermoacidophile Archaeobakterium Sulfolobus brierleyi (2, 5) als möglicher Metallmobilisierer für höhertemperaturige Lagerstätten diskutiert (2).

Ziel unseres Projektes ist es, durch ein intensives Screening-Programm nach neuen und andersartigen metallmobilisierenden Bakterien zu suchen, wobei diese isoliert und sowohl in ihrem Laugungsverhal-

ten als auch in taxonomisch-biochemischer Sicht charakterisiert werden sollen. Hierbei sollen im Hinblick auf eine mögliche spätere Anwendung bereits technologische Aspekte mit berücksichtigt werden: a) die Ansätze erfolgen auf Gemischen natürlicherweise in Deutschland vorkommender Erze, beispielsweise dem Erzgemenge G1 (Pyrit aus der Grube Bayerland; Chalkopyrit aus Bad Grund; Sphalerit aus der Grube Lüderich; Pechblende aus Poppenreuth). Da in den natürlichen Lagerstätten in der Regel keine signifikanten Mengen an organischem Material vorhanden sind, wird auf dessen Zusatz in den Anreicherungsmedien verzichtet. b) Die Abbauleistung auf dem groben, natürlichen Erz sollte nicht nur von der Stoffwechselgeschwindigkeit des Bakteriums, sondern auch von dessen "Korrosivität" und "Invasivität" abhängen, d.h. der Fähigkeit, in die Erzstücke einzudringen und sie zu zersetzen. Um diese Leistung testen zu können, wird im Labor relativ grob gemahlenes Erz (entsprechend dem kleinen Maßstab: 1 mm Korngröße) eingesetzt. c) Zur Prüfung einer möglichen Spezifität der Bakterien für bestimmte Metalle werden die 18 in signifikanter Menge im Erzgemenge vorkommenden Metalle routinemäßig im Laugungsüberstand quantitativ mit Hilfe eines ICP-Gerätes analysiert.

Die Anreicherung erfolgt in 100 ml Kulturflaschen, die 30 ml mineralische Flüssigkeit (6) sowie 1 g Erzgemenge enthalten. Diese Kulturen werden mit einer Frequenz von 150 Umdrehungen pro Minute geschüttelt. Die Bakterien werden anschließend durch Verdünnungsreihen und, soweit möglich, durch Plattierung auf verschiedenen festen, erzhaltigen Trägermedien gereinigt. Zum fluoreszenzmikroskopischen Nachweis der auf dem Erz wachsenden Bakterien wurde eine geeignete Färbemethode entwickelt (Abb. 2; Huber et al., im Druck). Zur Zeit betreuen

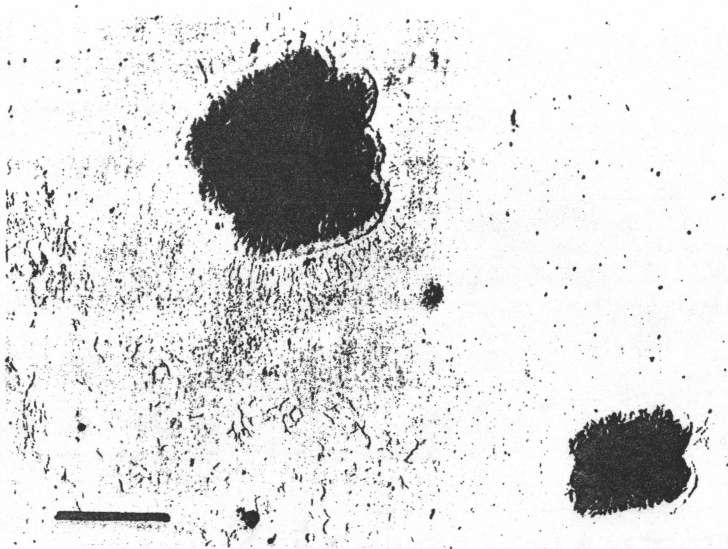


Abb.1: Thiobacillus ferrooxidans ATCC 23270; Maßstab 1  $\mu\text{m}$

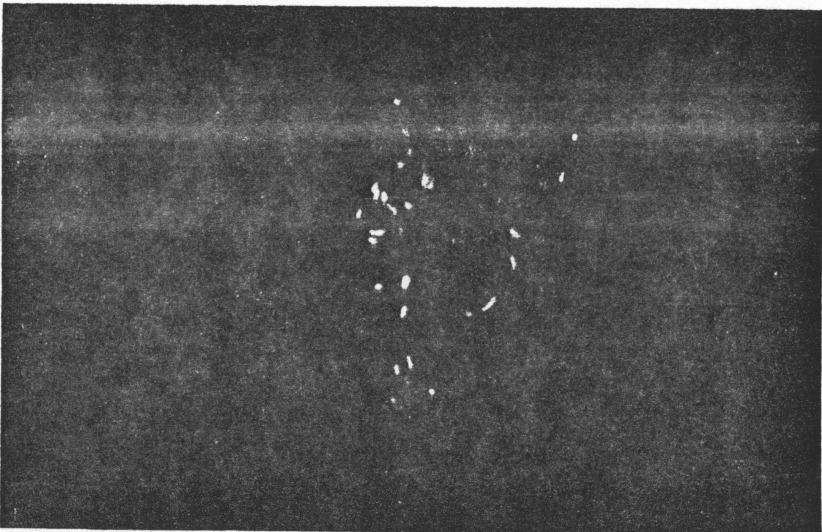


Abb.2: Dem Erz aufsitzende laugungsaktive Bakterien (Isolat SP5/2).  
Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme; Maßstab 10  $\mu\text{m}$



wir etwa 1500 verschiedene Anreicherungskulturen. Die Versuche sind noch nicht abgeschlossen.

Das Screening bezieht sich auf zwei verschiedene Biotope:

- a) alte Erzlagerstätten, wie Bergwerke und Halden, bei denen durch eingedrungene Nässe bereits eine mehr oder weniger starke natürliche mikrobielle Metallmobilisierung stattfindet. Hierbei sollte vor allem auf heimische Lagerstätten zurückgegriffen werden, beispielsweise auch auf solche in der nördlichen Oberpfalz.
- b) In Entstehung begriffene Erzlager in vulkanischen Gebieten sowohl kontinentaler (Italien, Island, Japan, Azoren, USA) als auch submariner (Azoren, Vulcano, Neapel, Atlantis II Tief, South Pacific Rise) Art. Hierbei war anzunehmen, daß wegen des verfügbaren Wassers ideale Bedingungen für leistungsfähige Erzabbauer herrschen sollten. Es sollten sowohl mesophile (Temperaturbereich 10 - 40°C) als auch thermophile (Temperaturbereich 50 - 80°C) Organismen angereichert werden.

Bei den thermophilen Organismen zeigte sich zunächst bei Sulfolobus brierleyi (2), daß dieses Bakterium nicht in der Lage war, unser Erzgemenge anzugreifen. Dies traf sowohl für die von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen (DSM 1651) als auch direkt von Corale Brierley bezogenen Kulturen zu, was auch von anderen Forschergruppen beobachtet wurde (A. Torma, pers. Mitteilung; W. Sand, pers. Mitteilung). In den anderen Merkmalen, wie dem für Sulfolobus relativ niedrigen Temperaturoptimum von 65°C sowie dem Wachstum auf  $\text{FeSO}_4$  oder  $\text{S}_0$  stimmt der Stamm grundsätzlich mit der Beschreibung (2) überein, obwohl Hefeextrakt zusätzlich erforderlich ist. Die

Fähigkeit dieses Stammes, auf natürlichen Erzen zu wachsen, könnte möglicher Weise ursprünglich auf einem verlorengegangenen Plasmid codiert gewesen sein. Ähnlich Sulfolobus brierleyi zeigten 40 extrem thermophile Sulfolobus-Isolate, die von W. Zillig (Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried) und uns ursprünglich auf  $S_0$  von Solfatarengelieten Islands, Japans, Italiens, den Azoren sowie der USA angereichert worden waren, ebenfalls keine Metallmobilisierung und kein Wachstum auf Erz. Auf  $S_0$ , meist erst in Gegenwart von Hefeextrakt, säuerten diese Stämme zwar das Medium stark an, für die Erzlaugung kommen sie jedoch nicht in Frage.

Kürzlich gelang es uns, aus den Vulkangebieten Italiens und Islands 5 coccoide thermophile Bakterienstämme (Abb. 3) auf dem Erzgemenge G1 anzureichern und sie durch Reihenverdünnung zu isolieren. Drei der neuen Isolate besitzen ein Temperaturoptimum von  $80^{\circ}\text{C}$  und sind deshalb extrem thermophil. Sie zeigen eine bisher unbekannte ausgeprägte Kältesensitivität, sodaß sie heiß überimpft werden müssen. Die beiden anderen Isolate haben, wie Sulfolobus brierleyi, ein Temperaturoptimum von nur  $65^{\circ}\text{C}$ . Ob es sich bei diesen neuartigen Erzlaugern um Archaeobakterien handelt, müssen erst physiologische und molekularbiologische Untersuchungen an Zellmaterial nach Anzucht in größerem Stil zeigen. Erste Untersuchungen zur Laugungsaktivität dieser thermophilen Stämme haben gezeigt, daß es sich hierbei im Vergleich mit anderen Erzlaugern um die schnellsten Kupfermobilisierer handelt (Tab. 1). Darüber hinaus laugen sie das Kupfer anscheinend bevorzugt gegenüber anderen Metallen. Diese Isolate benötigen keinerlei organisches Material im Kulturmedium. Wir wollen untersuchen, ob ihre Fähigkeit zur Erzlaugung plasmidcodiert

ist und ob diese Eigenschaft bei Kultivierung auf anderen Substraten, beispielsweise Schwefel, verlorenght. Die thermophilen Stämme könnten besonders zur in situ-Laugung tiefliegender Erzadern, die durch die Geothermalwärme aufgeheizt wurden, geeignet sein.

Auch von Standorten mit gemäßigten Temperaturen konnten wir einige neuartige Metallmobilisierer isolieren:

Aus dem Uranbergwerk "Schacht Höhenstein", Poppenreuth (Oberpfalz) erhielten wir 2 Isolate (Hö3 und Hö5), die im Gegensatz zu den bekannten Metallmobilisierern auf natürlichen Erzen, nicht aber auf Schwefel, Thiosulfat oder Eisen-II-sulfat wachsen. Es handelt sich um kurze, dünne Stäbchen ( $0.3 \mu\text{m } \varnothing$ ), die sich somit bereits morphologisch von Thiobacillen unterscheiden (Abb. 4). Proteinvergleiche aus Zellextrakten mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophoresen haben gezeigt, daß diese Neuisolate in ihren Proteinstereinstellungen ebenfalls sehr verschieden von denen der metallmobilisierenden Thiobacillen sind, während letztere untereinander ein sehr ähnliches Muster zeigen. Die neuen Isolate wachsen zwischen 25 und 45°C mit einem Optimum bei 41°C. Der günstigste pH-Bereich liegt zwischen pH 4 und 5.5, sodaß diese Organismen viel weniger acidophil als Thiobacillen sind. Im Vergleich mit anderen Metallmobilisierern laugen diese Bakterien ganz bevorzugt Kupfer (Tab. 1), was auf eine bisher unbekannte Metallspezifität dieser laugungsaktiven Bakterien hindeutet. Die molekularen Ursachen hierfür sowie die physiologisch-biochemischen Parameter sollen in weiteren Untersuchungen geklärt werden.

Aus einem erzbildenden submarinen Hydrothermalsystem bei Vulcano (7) konnten wir 2 Isolate (LM3 und L7) von dünnen langen Stäbchen (Abb. 5)

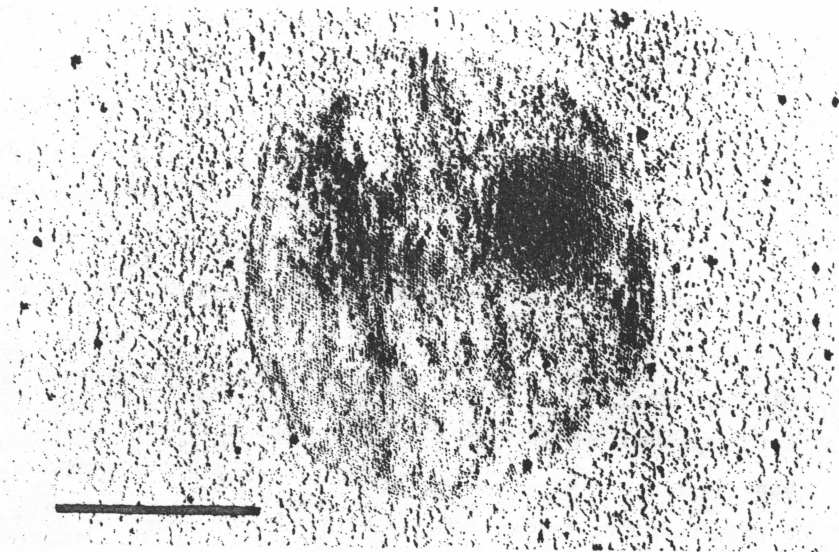


Abb.3: Thermophiles, metallmobilisierendes Isolat TH4; Maßstab 0.5  $\mu\text{m}$

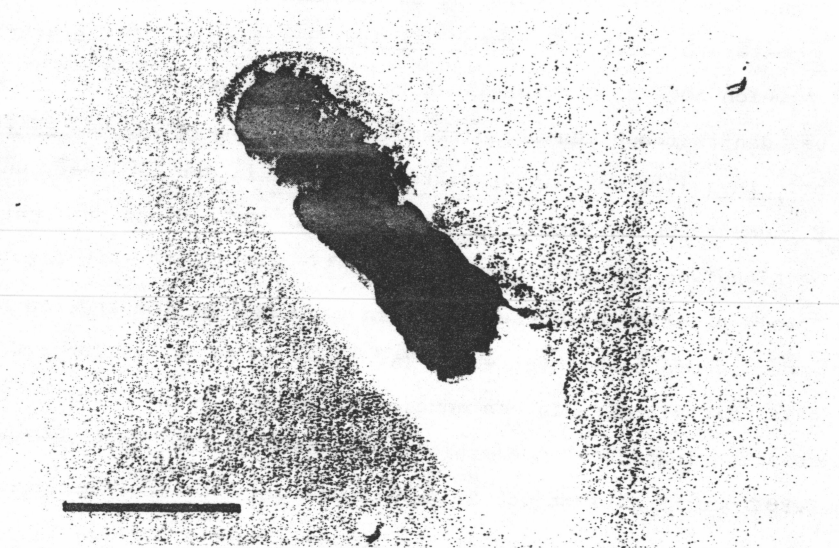


Abb.4: Stamm H05, isoliert aus Schacht Höhenstein, Oberpfalz;  
Maßstab 0.5  $\mu\text{m}$



Abb.5: Marines Isolat LM3; Maßstab 1  $\mu$ m

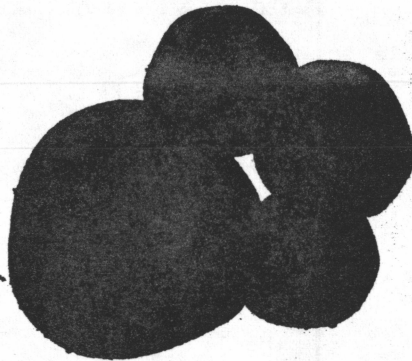


Abb.6: Coccoides, mesophiles Isolat SP5/1; Maßstab 1  $\mu$ m

erhalten, die auf Erzgemenge G1 bei Temperaturen zwischen 25 und 41°C wachsen. Die schnellste Verdopplungszeit beträgt etwa 8 Std. (37°C). Auf anderen Substraten wie Eisen-II-sulfat, Schwefel oder Thiosulfat wachsen diese Bakterien nicht oder nur wesentlich schwächer als Thiobacillen. Darüber hinaus unterscheiden sie sich von letzteren durch ihr signifikant verschiedenes Proteilmuster sowie durch einen wesentlich höheren G+C-Gehalt von 68% (Thiobacillen 58 - 62% G+C) in ihrer DNA.

Ein weiteres ungewöhnliches erzlaugendes Isolat (SP5/1) konnten wir aus einer mäßig warmen solfatarischen Quelle in Pisciarelli Solfatara erhalten. Diese kugelförmigen, in ihrem Durchmesser stark variablen Organismen (Abb. 6) wachsen in einem Temperaturbereich zwischen 25 und 37°C mit einer optimalen Verdopplungszeit auf Erzgemenge G1 von 5 Std. bei 30°C. Neben verschiedenartigsten Erzen wächst dieses Isolat, ähnlich den Thiobacillen, auch sehr gut auf Natriumthiosulfat, Schwefel sowie Eisen-II-sulfat. Die taxonomische Stellung dieses Bakteriums ist noch offen. Zellwandanalysen haben jedoch den positiven Nachweis für Murein erbracht, sodaß es sich mit sehr großer Wahrscheinlichkeit nicht um ein Archaeobakterium handelt.

Bei unserem Screening isolierten wir bisher auch mehrere Leptospirillum-artige Organismen, beispielsweise Stamm SP4/1 (Abb. 7), aus den kühleren solfatarischen Quellen Italiens, Islands und den USA. Ähnlich den bereits bekannten Stämmen (4) wachsen diese auf Pyrit oder durch Oxidation von  $\text{Fe}^{2+}$ . Auf Chalcopyrit zeigt sich nur ein sehr schlechtes Wachstum, was möglicher Weise auf der hohen Sensitivität gegenüber Kupferionen (50 ppm  $\text{Cu}^{2+}$ ) beruht. Für einen Einsatz

bei der mikrobiellen Wertmetallgewinnung scheinen diese Isolate deshalb weniger geeignet zu sein. Das von uns näher bearbeitete Isolat SP4/1 unterscheidet sich im G+C-Gehalt seiner DNA (54% G+C) deutlich von Leptospirillum ferrooxidans DSM 2705 (49% G+C), sodaß es sich um eine neue Art der Gattung Leptospirillum handeln dürfte.

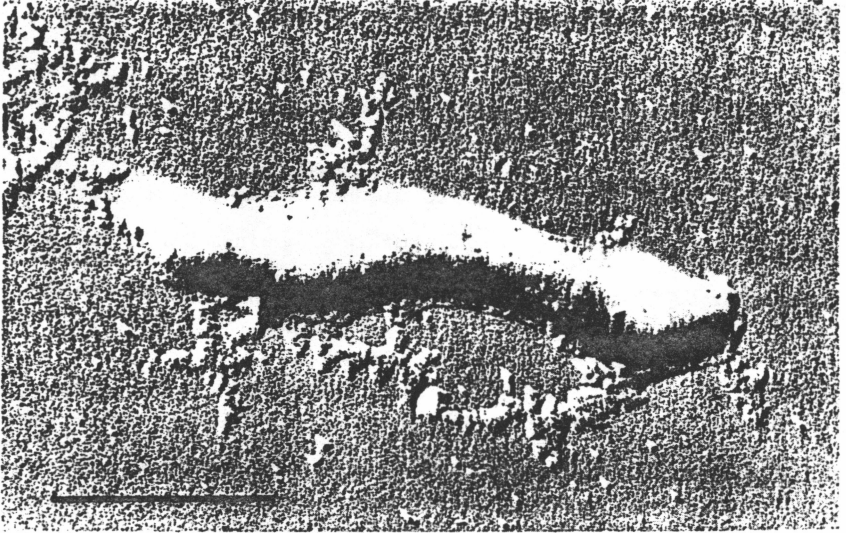


Abb.7: Leptospirillum-ähnliches Isolat SP4/1; Maßstab 1  $\mu$ m

Auch ca. 80 erzlaugende Thiobacillen konnten von verschiedensten Standorten isoliert werden, von denen die aktivsten als definierte Mischkulturen mit unseren andersartigen Isolaten geprüft werden sollen. Es zeigte sich (Tab. 1), daß die Laugungsaktivität der verschiedensten Metallmobilisierer trotz identischer Bedingungen um mehr als eine Größenordnung verschieden sein kann (z.B. bei Kupfer), sodaß der Einsatz leistungsfähiger ausgewählter Kulturen in Zukunft

Tab.1 Vergleich der Laugungswerte der Neuisolat mit bekanntenThiobacillus ferrooxidans Stämmen

Wachstum auf Erzgemenge G1 (Korngröße < 1mm); Beimpfung 2%; Laugungswerte in mg/l nach 28 Tagen Inkubation; Wert der Sterilkontrolle bereits abgezogen

Elemente Stämme	Cu	Zn	U
Maximalwert (= lösl. in kochen- dem Königwasser)	2100	4700	90
Thiobacillus ferroox.			
ATCC 23270	135	2250	50
ATCC 19859	18	1600	10
DSM 1927	128	5080	54
T. ferroox. Isolate			
Ra8	74	2340	45
Ra11/2	109	5200	93
Sch2	74	2330	29
OP4/St.5	96	4000	96
SP5/2	110	950	-
SP6	110	4300	56
Kr10	130	2400	36
CH5	180	2450	59
andersartige mesophile Isolate			
SP5/1	130	2000	-
LM3	60	1610	82
L7	125	2100	100
Hö5	270	300	25
thermophile Isolate			
TH4	566	2250	80



eine große Praxisrelevanz haben wird. Die beim Isolat H85 aufgezeigte Kupferspezifität (Tab. 1) deutet darauf hin, daß Metallspezifitäten bei Metallmobilisierern vorhanden sein können und daß es sich auch vom Standpunkt einer späteren einfacheren Aufarbeitungstechnologie her lohnt, nach ähnlichen Organismen auch für andere Metalle zu suchen.

Unser Dank gilt Frau Hannelore Nowarra für die exzellente technische Assistenz sowie dem BMFT für die Förderung dieser Forschung.

Literatur

1. Bosecker, K.: Mikrobielle Laugung - Einsatz von Bakterien zur Gewinnung metallischer Rohstoffe. Forum Mikrobiologie 2, 98 - 103 (1980)
2. Brierley, C.L.: Bacterial leaching. CRC Critic. Rev. Microbiol. 207 - 262, Nov (1978)
3. Balashova, V.V., Vedenina, I.Ya., Markosyan, G.E. and Zavarzin, G.A.: The autotrophic growth of *Leptospirillum ferrooxidans*. Mikrobiologiya 43, 581 - 585 (English translation pp. 491 - 494) (1974)
4. Norris, P.R.: Iron and mineral oxidation with *Leptospirillum*-like bacteria. In: Recent Progress in Biohydrometallurgy. Eds.: Rossi, G. and Torma, A.E., 83 - 96 (1983)
5. Zillig, W., Stetter, K.O., Wunderl, S., Schulz, W., Priess, H., Scholz, I.: The *Sulfolobus* - "*Caldariella*" group: Taxonomy on the basis of the structure of DNA-dependent RNA polymerases. Arch. Microbiol. 125, 259 - 269 (1980)
6. Silverman, M.P., Lundgren, D.G.: Studies on the chemoautotrophic iron bacterium *Ferrobacillus ferrooxidans*. I. An improved medium and a harvesting procedure for securing high cell yields. J. Bacteriol. 77, 642 - 647 (1959)
7. Wauschkuhn, A., Gröpper, H.: Rezente Sulfidbildung auf und bei Vulcano, Molische Inseln, Italien. N. Jb. Miner. Abh. 126, 87 - 111 (1975)