

# Abschlussbericht Max-Buchner Forschungsstipendium

*Kennziffer 2885: Entwicklung eines Reaktorsystems für die mikrobielle Sulfatentfernung und Charakterisierung der mikrobiellen Lebensgemeinschaft mit Hilfe molekulargenetischer Methoden*

---

## Abstract

In Bergbaugebieten mit sulfid- und eisenhaltigen Mineralen kommt es natürlicherweise und verstärkt durch die menschliche Tätigkeit zur Bildung saurer, mit hohen Metall-, Sulfat- und Spurenstoffkonzentrationen belasteter Wässer. Im Rahmen des von der Siemens AG finanziell geförderten Forschungsprojektes erfolgt schwerpunktmäßig die Betrachtung der Sulfatbelastung und der Möglichkeit des Einsatzes der biologischen Sulfatreduktion für die Reinigung dieser Bergbauwässer. Ein Bioreaktor mit einem beweglichen Sandbett sollte als Kernstück dieses biologischen Verfahrens etabliert werden. In Laborversuchen erfolgte einerseits die Untersuchung verfahrenstechnischer Aspekte (z.B. hydraulische Aufenthaltszeit, Frequenz der Sandbettumwälzung in den Reaktoren, Einsatz verschiedener Elektronendonatoren), die einen Einfluss auf die Sulfatreduktionsleistung der Bioreaktoren haben könnten. Andererseits sollten mit Hilfe ausgewählter molekularbiologischer Methoden (z.B. PCR, T-RFLP, FISH, Pyrosequenzierung) die Auswirkungen der einzelnen verfahrenstechnischen Parameter auf die qualitative und quantitative Zusammensetzung der mikrobiellen Lebensgemeinschaft in den Bioreaktoren analysiert werden. Nach der erfolgreichen Etablierung und Durchführung der biologischen Sulfatreduktion im Labormaßstab sind Versuche mit realem Bergbau-beeinflusstem Wasser am Tagebau Nochten (Oberlausitz/Sachsen) durchgeführt worden.

## Inhaltsverzeichnis

1. Zielstellungen des Forschungsprojektes .....	3
2. Zusammenfassung des ersten Förderzeitraumes .....	3
3. Zusammenfassung der Ergebnisse im zweiten Förderzeitraum .....	4
3.1 Bioreaktorversuche am Tagebau Nochten.....	4
3.2 Einfluss der Sandbettumwälzung auf die biologischen Sulfatreduktionsraten .....	7
3.3 Weiterbetrieb der Reaktoren aus dem Versuch zur Sandbettumwälzung .....	11
3.4. Erstellung einer 16S rRNA Genfragment Bibliothek für Archaeen.....	12
3.5 Effizienz unterschiedlicher Elektronendonatoren für die Sulfatreduktion .....	13
3.6 Quantitative Untersuchung der Diversität der mikrobiellen Gemeinschaft.....	16
3.7 Sonstiges .....	18

## 1. Zielstellungen des Forschungsprojektes

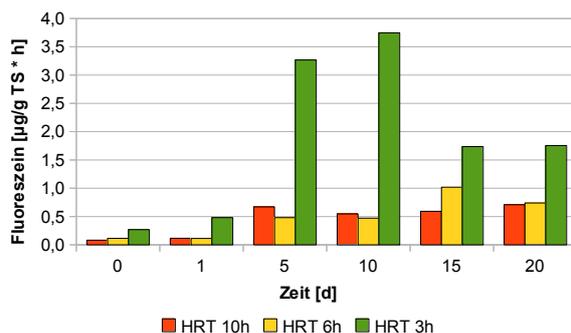
1. verfahrenstechnische Aspekte des Prozesses der biologischen Sulfatreduktion in einem Bioreaktor mit bewegtem Sandbett
2. Analyse der Zusammensetzung der mikrobiellen Lebensgemeinschaft innerhalb der Bioreaktoren mit Hilfe molekularbiologischer Analysemethoden
3. Überprüfung der Auswirkungen einzelner verfahrenstechnischer Parameter auf die mikrobielle Lebensgemeinschaft und die Effizienz der biologischen Sulfatreduktion

## 2. Zusammenfassung des ersten Förderzeitraumes

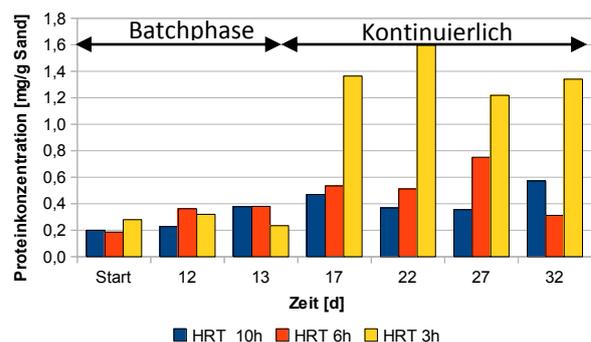
Der Schwerpunkt der Arbeiten im zurückliegenden Zeitraum lag auf der Durchführung von Reaktorversuchen, die den Nachweis erbringen sollten, dass mit abnehmender hydraulischer Verweilzeit (HRT) eine Zunahme der mikrobiellen Aktivität und damit eine Steigerung der Sulfatreduktionsgeschwindigkeit möglich ist.

Die Analysenergebnisse bestätigten die Arbeitshypothese in vollem Umfang. Während bei einer HRT von 10h die Sulfatreduktionsgeschwindigkeit einen Wert von  $5,2 \text{ mg SO}_4^{2-}/\text{L} \cdot \text{h}$  aufwies, konnte dieser auf Werte von  $33,8$  (HRT 6h) bzw.  $47,7 \text{ mg SO}_4^{2-}/\text{L} \cdot \text{h}$  (HRT 3h) gesteigert werden.

Die Werte der Gesamtaktivität und der Biomasse bestimmt in Form der Proteinkonzentration im Biofilm bestätigten die Steigerung der Reaktorleistung ebenfalls durch deutlich höhere Messwerte bei kürzer werdenden hydraulischen Verweilzeiten (siehe Abb. 1 und 2).



**Abb.1:** Mikrobielle Gesamtaktivität während des kontinuierlichen Betriebes



**Abb.2:** Proteinkonzentrationen auf dem Sand (Biofilm) der 3 Reaktoren mit unterschiedlichen HRT während der Batch- und der kontinuierlichen Phase

Durch die Erstellung einer 16S rRNA Klonbibliothek im Rahmen einer Bachelorarbeit konnte erstmals ein Teil der in den Bioreaktoren vorhandenen Bakterien taxonomisch identifiziert werden. Die Ergebnisse zeigen eine sehr diverse Mischkultur (siehe Tab.1).

**Tab.1:** Kurze Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse der Klonbibliothek der 16S rRNA Genfragmente

Phylogenetische Gruppe	Anteil an analysierten Klonsequenzen	Dominierende Taxa	Gattungen	Gefundene Sequenzen zeigen Ähnlichkeit mit (Bsp.):
<i>Firmicutes</i>	55%	<i>Clostridia</i>	<i>Clostridium</i>	<i>C. sartagoforme</i> , <i>C. bifermentas</i>
			<i>Desulfotomaculum</i>	<i>D. thermosapovorans</i> , <i>D. guttoideum</i>
<i>Proteobacteria</i>	21%	<i>Betaproteobacteria</i> <i>Gamma proteobacteria</i>	<i>Comamonas</i>	<i>C. testosteroni</i>
			<i>Pseudomonas</i>	<i>P. putida</i>
			<i>Aeromonas</i>	<i>A. hydrophila</i>
<i>Bacteroidetes</i>	20%	<i>Bacteroides</i>	<i>Proteiniphilum</i>	<i>P. acetatigenes</i>
			<i>Petrimonas</i>	<i>P. sulfuriphila</i>
<i>Actinobacteria</i>	4%			unkultiviertes Actinobakterium

Mit Hilfe der ebenfalls aufgebauten 16S rRNA Genfragment Bibliothek wird es möglich sein, die TRFLP-Analysen, die der Analyse der Änderungen innerhalb der mikrobiellen Gemeinschaft über die Zeit dienen, genauer auszuwerten, indem nun eine Zuordnung der einzelnen TRFLP-Peaks zu identifizierten Spezies möglich ist.

Eine durch Robert Klein betreute Diplomarbeit, die ausgewählte Parameter und deren Einfluss auf die Sulfatreduktionsleistung bzw. die Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaft untersuchte, ist in dem zurückliegenden Zeitraum ebenfalls erfolgreich abgeschlossen worden. In den durchgeführten Versuchen konnten Einflüsse bestimmter Parameter (z.B. Temperatur, Verweilzeit) nachgewiesen und deutliche Änderungen innerhalb der sulfatreduzierenden Mischkultur mit Hilfe der TRFLP-Analysen gezeigt werden.

### 3. Zusammenfassung der Ergebnisse im zweiten Förderzeitraum

Innerhalb des zweiten Förderzeitraums sind einerseits Grundlagenuntersuchungen (z.B. hinsichtlich der qualitativen Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaft), weitere Versuche zum Einfluss verfahrenstechnischer Parameter und Versuche unter realen Bedingungen an einem Tagebau mit dem dort anfallenden Bergbau-beeinflusstem Wasser durchgeführt worden. In den folgenden Abschnitten wird auf die einzelnen Versuche im Detail eingegangen.

#### 3.1 Bioreaktorversuche am Tagebau Nochten

Alle bisher durchgeführten Experimente sind unter Laborbedingungen durchgeführt worden, d.h. es ist nicht mit realem Bergbau-beeinflusstem Wasser, sondern nur mit einem fiktiven, aus Nährsalzen selbst zusammengestellten, sulfathaltigen und saurem Wasser gearbeitet worden. Dieses kann natürlich nicht zu 100% die chemische Zusammensetzung eines Tagebaugrundwassers mit allen Haupt- und Spurenelementen nachbilden. So zeigten z.B. Erfahrungen der Firma G.E.O.S aus Freiberg, dass Versuche zur biologischen

Sulfatreduktion mit realem Bergbauwasser zu einer Steigerung der Sulfatreduktionsraten im Vergleich zu den Laborversuchen führten.

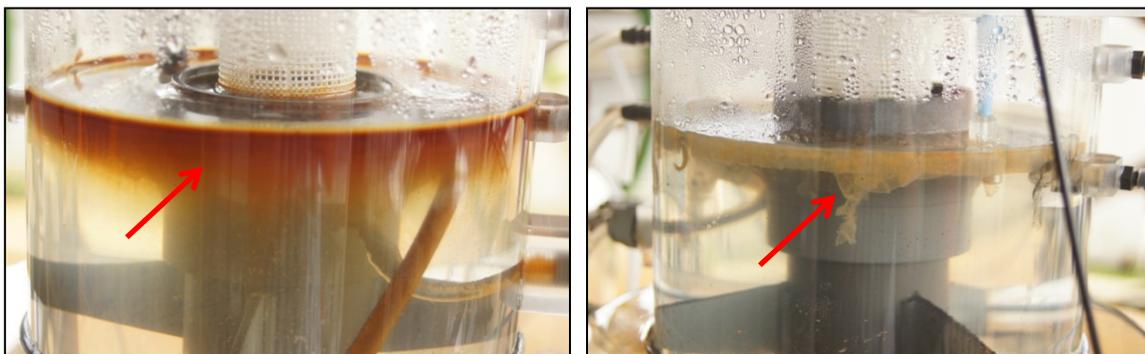
Die Ziele des Versuches am Braunkohletagebau Nochten (Oberlausitz) waren:

- Betrieb mit realem Bergbauwasser (Kippengrundwasser)
- Betrieb bei kontrollierter und erhöhter Reaktortemperatur
- Einfluss unterschiedlich hoher gelöster Eisenkonzentrationen auf die Sulfatreduktionsraten

Die Planungen sahen vor, die beiden dafür eingesetzten Bioreaktoren von Beginn der Batchphase am Tagebau Nochten zu betreiben. Die Besiedlung mit sulfatreduzierenden Mikroorganismen sollte durch das Animpfen mit im Labor bereits angezüchteten Kulturen und durch im Kippengrundwasser vor Ort vorkommende Sulfatreduzierer erfolgen, um eine möglichst hohe mikrobielle Diversität im Biofilm zu erhalten. Für den Versuchsbetrieb sind 2 Bioreaktoren eingesetzt worden. **Reaktor 1** ist mit dem vor Ort anfallenden Kippengrundwasser, welches pH-Werte im Bereich von 4.0-5,4 und hohe gelöste Eisenkonzentrationen ausweist, betrieben worden. Der Zulauf von **Reaktor 2** speiste sich dagegen aus dem Ablauf einer biologischen Eisenoxidationsanlage (Pilotanlage der Firma G.E.O.S Freiberg) mit niedrigeren pH-Werten im Bereich von 2.5-3.0 und deutlich geringeren gelösten Eisenkonzentrationen (ca. 150 mg/l). Als Elektronendonator kam Methanol zum Einsatz.

Um eine erhöhte Temperatur in den Bioreaktoren zu erreichen, erfolgte der Einsatz eines Wasserthermostats, der eine Innentemperatur der Bioreaktoren von ca. 35°C sicherstellen sollte. Hintergrund dieser Maßnahme ist die Erfahrung, dass in größer dimensionierten sulfidogenen Bioreaktoren Wärme durch den exothermen Prozess der biologischen Sulfatreduktion frei wird und zu erhöhten Innentemperaturen in solchen Reaktoren führt. Aufgrund der geringen Abmessungen der in diesem Versuch eingesetzten Reaktoren tritt dieser „Wärmeeffekt“ nicht in einem messbaren Umfang auf, soll aber durch den Einsatz des Thermostates simuliert werden.

Nach 3 Wochen Batchbetrieb konnte allerdings noch keine erfolgreiche Etablierung der Sulfatreduktion in beiden Reaktoren (beurteilt anhand der Bildung schwarzer Sulfid-Ausfällungen) festgestellt werden. Stattdessen bildeten sich in Reaktor 1 rotbraune Eisenausfällungen, während in Reaktor 2 eine deutliche Biofilmbildung nicht-sulfatreduzierender Mikroorganismen zu beobachten war (siehe Abb. 3).



**Abb. 3:** Beobachtungen in **Reaktor 1** (links) und **Reaktor 2** (rechts) am **Tagebau Nochten** nach 3 Wochen Batchbetrieb.

Die in Reaktor 1 gemessenen pH-Werte zeigten in dem Zeitraum eine Tendenz zu niedrigeren Werten, wie sie typisch für eine ablaufende (biologische) Eisenoxidation ist, anstelle steigender pH-Werte bei einer erfolgreichen biologischen Sulfatreduktion.

Als mögliche Gründe für die Nichtansiedlung von Sulfatreduzierenden in den beiden Reaktoren kommen u.a. in Frage:

- Animpfmenge an sulfatreduzierenden Mikroorganismen im Vergleich zum Gesamtvolumen der Bioreaktoren zu gering.
- Zu schneller/starker Wechsel der Umweltbedingungen zwischen Anzucht der Kulturen im Labor und den Bedingungen in den Reaktoren befüllt mit Kippengrundwasser.
- Mögliche Kontamination während z.B. der Probenahme vor Ort oder durch Eintrag mit Kippengrundwasser.

Aufgrund dieser Probleme wurde ein Neustart der beiden Reaktoren notwendig, der diesmal aber unter kontrollierten Bedingungen im Labor durchgeführt werden sollte. Nach erfolgreicher Etablierung der biologischen Sulfatreduktion erfolgte die Wiederinbetriebnahme der Bioreaktoren in Nochten. Um die Adaption der unter Laborbedingungen in den beiden Reaktoren angezogenen Biomasse an die Bedingungen in Nochten zu erleichtern wurde zu Beginn des Versuches nur mit geringen Pumpraten (d.h. hohe hydraulische Aufenthaltszeiten) gearbeitet. Diese Herangehensweise erwies sich als erfolgreich, da die mikrobiologische Sulfatreduktion in den beiden Bioreaktoren nach dem Neustart in Nochten stattfand.

Während dieses Versuches wurde bewusst auf eine Sandbettumwälzung in beiden Bioreaktoren verzichtet, um die möglichen, negativen Auswirkungen der vor allem im Kippengrundwasser vorhandenen hohen gelösten Eisenkonzentrationen zu veranschaulichen.

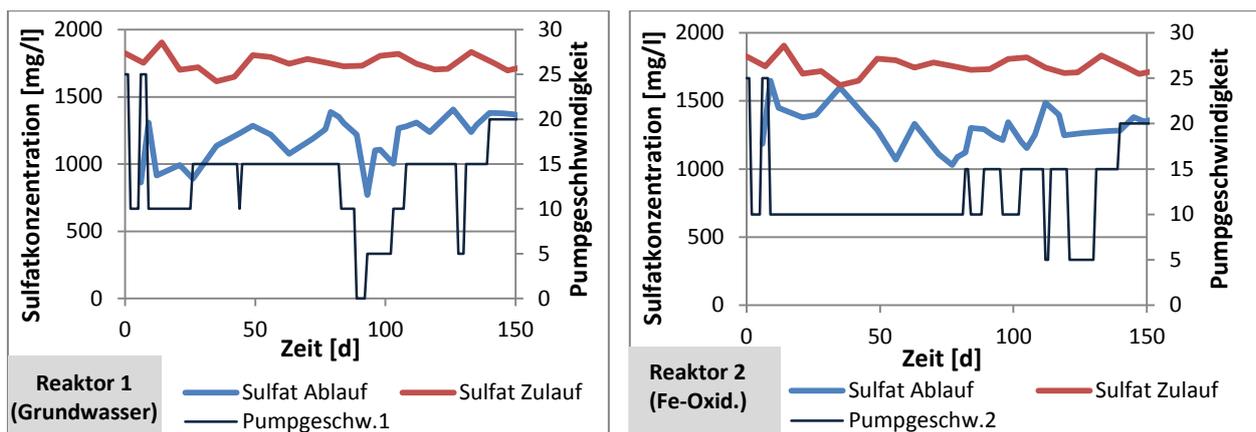


Abb.4: Verlauf der Sulfatkonzentrationen im Zu- bzw. Ablauf und eingestellter Pumpgeschwindigkeit der beiden Bioreaktoren

Reaktor 1 zeigte in der Anfangsphase des Betriebes eine deutlich höhere Sulfatreduktionsrate hinsichtlich des Sulfats (siehe Abb.4). Ein Grund für den verzögerten Start der Sulfatreduktion in Reaktor 2 könnte in dem niedrigen pH-Wert des Zulaufwassers zu suchen sein, an den sich die mikrobielle Gemeinschaft erst anpassen musste bzw. erst entsprechend angepasste Sulfatreduzierer sich im Reaktor ansiedeln musste. Ab Betriebstag

56 zeigte Reaktor 2 vergleichbare Sulfatentfernung wie Reaktor 1. Im weiteren Betriebsverlauf ist aber zu erkennen, dass die Menge entfernter Sulfats (messbar am Unterschied der Sulfatkonzentrationen im Zu- bzw. Ablauf der Reaktoren) einen abnehmenden Trend aufzuweisen scheint. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass es aufgrund der nicht durchgeführten Sandbettumwälzung zu einer immer stärkeren Ablagerung ausgefällter Metallsulfide auf dem Trägermaterial und dem Biofilm kommt, was zu einer stärker werdenden Hemmung des Stoffaustausches zwischen Lösung und Biofilm führen kann.

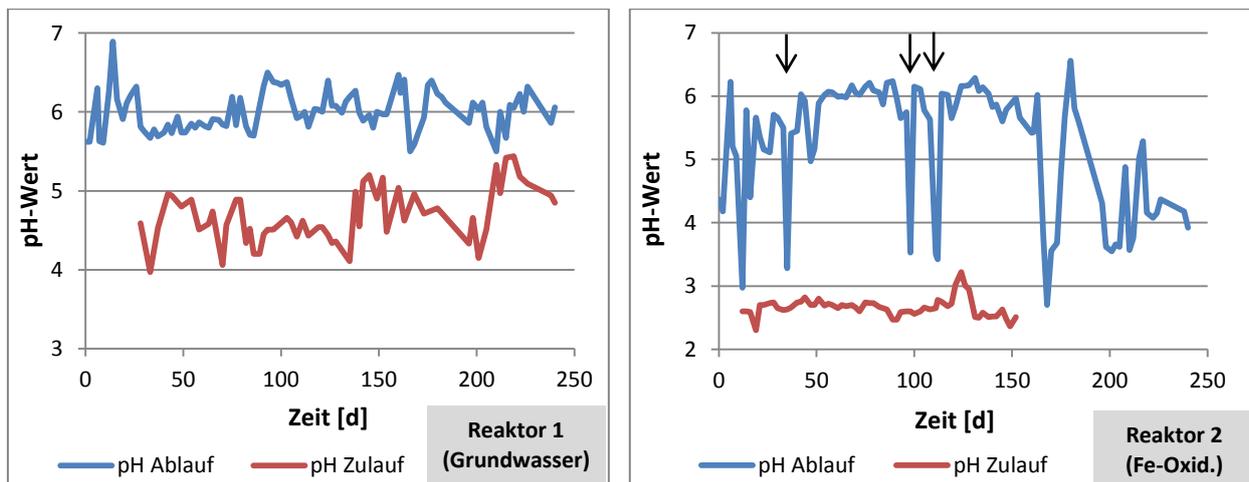


Abb.5: pH-Werte im Zu- bzw. Ablauf der beiden Bioreaktoren im Versuchszeitraum

Ab ungefähr Tag 180 scheint es in Reaktor 2 zu einem fast vollständigen Erliegen der biologischen Sulfatreduktion und der damit einhergehenden Neutralisierung des sauren Bergbauwassers zu kommen, da der pH-Wert im Ablauf immer weiter absinkt (siehe Abb.5). Da für den letztgenannten Zeitraum aber noch nicht alle Messdaten hinsichtlich der Sulfatkonzentrationen im Zu- bzw. Ablaufwasser vorliegen, kann dies aber noch nicht als gesichert angesehen werden. In Reaktor 1 ist der Rückgang des Neutralisierungspotentials zwar auch an den Tagen 196 – 215 zu erkennen, scheint sich anschließend aber wieder zu verbessern (zunehmende Differenz zwischen Zulauf- und Ablauf pH-Werten).

Während des Bioreaktorbetriebes zeigten sich aufgrund der für Laborbedingungen dimensionierten Reaktoren deutliche Probleme durch Ablagerung von Eisenverbindungen in den Verbindungsschläuchen und dadurch verursachte Verstopfungen, die den kontinuierlichen Betrieb der beiden Bioreaktoren in regelmäßigen Abständen immer wieder unterbrachen. In den Diagrammen von Abb.5 ist dies besonders gut an den kurzfristigen Rückgängen der pH-Werte im Ablauf der Reaktoren zu erkennen (schwarze Pfeile im Diagramm von Reaktor 2). Diese Probleme können nur durch eine entsprechende größere Dimensionierung der Reaktoren kombiniert mit einer effizienten vorgeschalteten Eisenentfernung verringert, aber sicherlich nicht ganz vermieden werden.

### 3.2 Einfluss der Sandbettumwälzung auf die biologischen Sulfatreduktionsraten

Ein besonderes Merkmal der in den Versuchen verwendeten Bioreaktoren ist die Möglichkeit der kompletten Umwälzung des darin enthaltenen Sandbetts. Eine der anfänglichen Arbeitshypothesen war, dass durch die Sandbettumwälzung die während der biologischen

Sulfatreduktion gebildeten Metallsulfide vom Trägermaterial Sand wieder abgelöst werden sollen, um so eine Überdeckung des Biofilmes und eine mit der Zeit abnehmende Reinigungsleistung (Sulfatreduktionsrate) zu verhindern. Weiterhin sollte dadurch eine zu große Biofilmdicke, die zur möglichen Unterversorgung der unteren Biofilmschichten führen kann, vermieden werden.

Bisher lagen aber noch keine Erfahrungen hinsichtlich der optimalen Frequenz der Sandbettumwälzung in den Bioreaktoren vor.



*Abb.6: Die drei während des Versuches zum Einfluss der Sandbettumwälzung eingesetzten Bioreaktoren in Betrieb*

Von den drei eingesetzten Bioreaktoren (siehe Abb.6) erfolgte im ersten (S1) keine Umwälzung des Sandbettes, im zweiten (S2) eine 30 minütige Umwälzung einmal pro Woche und im dritten (S3) jeden Tag eine 30 minütige Sandbettumwälzung im Versuchszeitraum. Alle anderen verfahrenstechnischen Parameter waren vergleichbar. Als Elektronendonator kam wieder Methanol zum Einsatz. Der Versuch wurde bei Raumtemperatur durchgeführt.

Wie schon bei den vorangegangenen Reaktorversuchen unterteilte sich der Versuch in eine anfängliche Batchphase (27 Tage) und die daran anschließende kontinuierliche Betriebsphase (20 Tage). Für letztere ist eine hydraulische Aufenthaltszeit (HRT) von 4h für alle drei Reaktoren gewählt worden. Die im Vergleich zum vorangegangenen Reaktorversuch längere Batchphase von 27 Tagen (vorher 12 Tage) war darin begründet, dass zu Beginn des Versuches eine längere Lag-Phase eintrat, d.h. das Wachstum der Biomasse nur verzögert begann.

Die Ergebnisse dieses Versuches zum Umwälzverhalten sind in Abb.7 zusammengefasst.

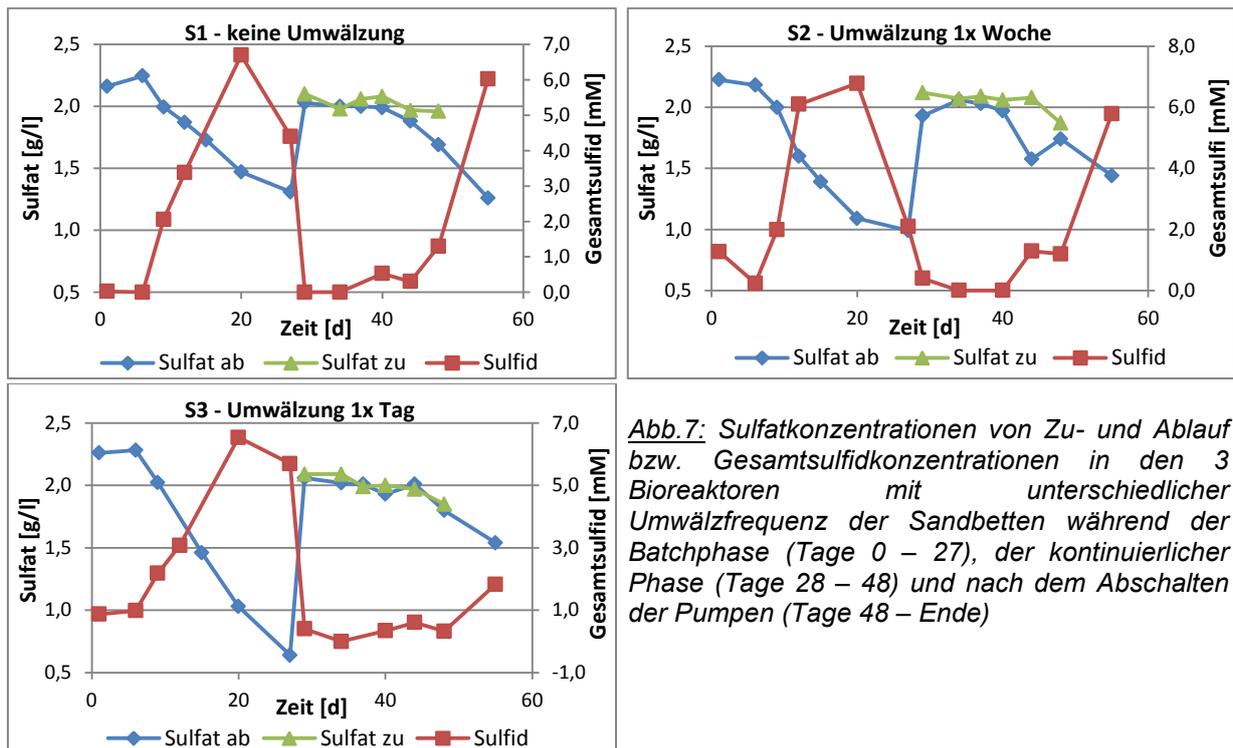


Abb.7: Sulfatkonzentrationen von Zu- und Ablauf bzw. Gesamtsulfidkonzentrationen in den 3 Bioreaktoren mit unterschiedlicher Umwälzfrequenz der Sandbetten während der Batchphase (Tage 0 – 27), der kontinuierlicher Phase (Tage 28 – 48) und nach dem Abschalten der Pumpen (Tage 48 – Ende)

Entgegen den Erwartungen konnten die höchsten Sulfatreduktionsraten in Reaktor S1 ohne jegliche Sandbettumwälzung ermittelt werden (siehe Tab.2).

Tab. 2: Sulfatkonzentrationen und maximale Differenzen dieser zwischen Zulauf- und Ablauf der drei Bioreaktoren während des kontinuierlichen Betriebs in Abhängigkeit von der Häufigkeit der Sandbettumwälzung (HRT = 4h)

	Ohne Umwälzung	1x pro Woche	1x pro Tag
Max. Differenz $\text{SO}_4^{2-}$ Zulauf – $\text{SO}_4^{2-}$ Ablauf	270 mg	130 mg	50 mg
Sulfatreduktionsrate [mg $\text{SO}_4^{2-}$ /l*h]	67,5	32,5	12,5

Eine Erklärung für dieses Versuchsergebnis könnten die in der Nährlösung vorliegenden niedrigen gelösten Eisenkonzentrationen sein. Durch deren niedrige Konzentration könnte der Effekt der Überlagerung des Biofilmes durch ausfallendes Eisensulfid möglicherweise in diesem Laborversuch nur eine untergeordnete Rolle gespielt und die Sandbettumwälzung hauptsächlich den Biofilm entfernt haben. Dies könnte ein Grund dafür sein, dass es in Reaktor S3 mit täglicher Sandbettumwälzung fast keine Sulfatreduktion während der kontinuierlichen Betriebsphase feststellbar war. Allerdings ist nach Beendigung des Versuchs (Abschalten der Förderpumpen an Tag 48) ein Anstieg der Gesamtsulfidkonzentration in der Reaktorlösung und eine Abnahme der Sulfatkonzentration zu erkennen (siehe Abb.7). Somit kann vermutet werden, dass die häufige Umwälzung in S3 sich negativ auf die biologische Sulfatreduktion auswirkte.

Eine weitere Möglichkeit der Erklärung für die geringen Sulfatreduktionsraten in den beiden Reaktoren mit Sandbettumwälzung könnte auch sein, dass die in den Bioreaktoren befindlichen Sulfatreduzierer auf den Abbau des Methanols durch andere Mikroorganismen angewiesen sind, d.h. erst die gebildeten Abbauprodukte (z.B. Acetat, Wasserstoff) als Elektronendonator für die Sulfatreduktion nutzen können. Wird das Sandbett in den Reaktoren umgewälzt, beeinflusst dies auch den Biofilm, der dadurch teilweise abgetragen und zerstört wird. Dies kann eine Unterbrechung bereits etablierter „Intermediatenflüsse“ zwischen den Methanol-abbauenden Mikroorganismen und den Sulfatreduzierern zur Folge haben, was letztendlich zu einer sinkenden Sulfatreduktionsleistung aufgrund der nicht ausreichenden Versorgung mit notwendigen Elektronendonatoren führen kann. Eine derartig räumlich enge Symbiose zwischen Sulfatreduzierenden Bakterien und anderen Mikroorganismen ist aus der Literatur bekannt.

Während des Versuches konnte teilweise eine starke Gasbildung in den Reaktoren während der kontinuierlichen Betriebsphase, die sich in der Ansammlung einer größeren Anzahl von Gasblasen in den Sandbetten der Reaktoren widerspiegelte, beobachtet werden. Das war besonders in den beiden Bioreaktoren mit Sandbettumwälzung (S2 und S3) der Fall. Hier kann vermutet werden, dass sich in diesen beiden Reaktoren vor allem konkurrierende Mikroorganismen, wie Fermentierer (z.B. *Clostridia* Spezies) oder methanogene Archaeen ansiedeln konnten, die durch ihre Tätigkeit zu dieser starken Gasbildung führten (z.B. CO<sub>2</sub>-Bildung durch Fermentierer, Methanbildung durch methanogene Archaeen). Die Bestimmung der Gesamtaktivität (anhand der Hydrolaserate von Fluoreszeindiacetat) bestätigte dies durch deren hohe Werte in diesen beiden Reaktoren, insbesondere am Ende der kontinuierlichen Phase. Eine gaschromatographische Analyse einer Gasprobe aus diesen Reaktoren zeigte als Hauptbestandteile Methan (26-29 vol%) und CO<sub>2</sub> (ca. 4 vol%), was die These des Vorhandenseins methanogener und fermentierender Organismen untermauerte.

Aus den Ergebnissen des Versuches kann aber auch abgeleitet werden, dass der Zeitraum der kontinuierlichen Phase (20 Tage) wahrscheinlich zu kurz war, um endgültige Aussagen hinsichtlich der Auswirkungen der Sandbettumwälzung auf die Entwicklung der Sulfatreduktionsraten treffen zu können. Zumindest bei den Messwerten der Sulfatkonzentration ergibt sich der Eindruck, dass erst zum Ende des Versuchszeitraumes die Differenz zwischen Zulauf- und Ablaufkonzentration größer wird, d.h. eine längere Betriebsphase der Bioreaktoren notwendig ist, um eine biologische Sulfatreduktion im größerem Umfang in den Reaktoren zu erreichen. Dieser Umstand ist bereits in einigen wissenschaftlichen Veröffentlichungen diskutiert worden. Dort werden z.B. Zeiträume im Bereich von 100 – 300 Tagen genannt, die notwendig wären, um eine Dominanz sulfatreduzierender Mikroorganismen in sulfidogenen Bioreaktoren sicherzustellen.

Jedoch hat der Versuch die negativen Auswirkungen der zu häufigen Sandbettumwälzung auf die Sulfatreduktionsrate gezeigt – allerdings nur für saure Wasser mit niedriger Eisenbelastung. Allerdings ist in nächster Zeit ein Versuch geplant, der den Einfluss der Sandbettumwälzung unter Verwendung des Bergbau-beeinflussten Wassers am Tagebau Nochten mit seinen hohen gelösten Eisenkonzentrationen untersuchen soll.

### 3.3 Weiterbetrieb der Reaktoren aus dem Versuch zur Sandbettumwälzung

Aufgrund der Tatsache, dass in den Versuchen zum Einfluss der Hydraulischen Aufenthaltszeit bzw. der Sandbettumwälzung relativ kurze Versuchszeiträume (kontinuierliche Phase = 20 Tage) gewählt worden sind, liefen 2 der Reaktoren (ohne Umwälzung, tägliche Umwälzung) aus dem Umwälzversuch einen gewissen Zeitraum nach Abschluss des eigentlichen Versuches im kontinuierlichen Betrieb (HRT = 7h) weiter.

Im betrachteten Zeitraum von 39 Tagen hat sich der Trend aus dem vorangegangenen Umwälzversuch bestätigt, d.h. der Reaktor ohne jegliche Sandbettumwälzung zeigte die höheren Sulfatreduktionsraten, als der Reaktor mit täglicher Umwälzung. Während der höchste gemessene Unterschied zwischen der Sulfatkonzentration im Zu- und Ablauf bei ersterem (ohne Umwälzung) bei 340 mg lag, betrug er bei letzterem (tägliche Umwälzung) 180 mg.

Die höhere Sulfatreduktion in Reaktor S1 (ohne Umwälzung) wird weiterhin durch die ermittelten pH- und Redoxpotentialwerte untermauert (siehe Abb.8).

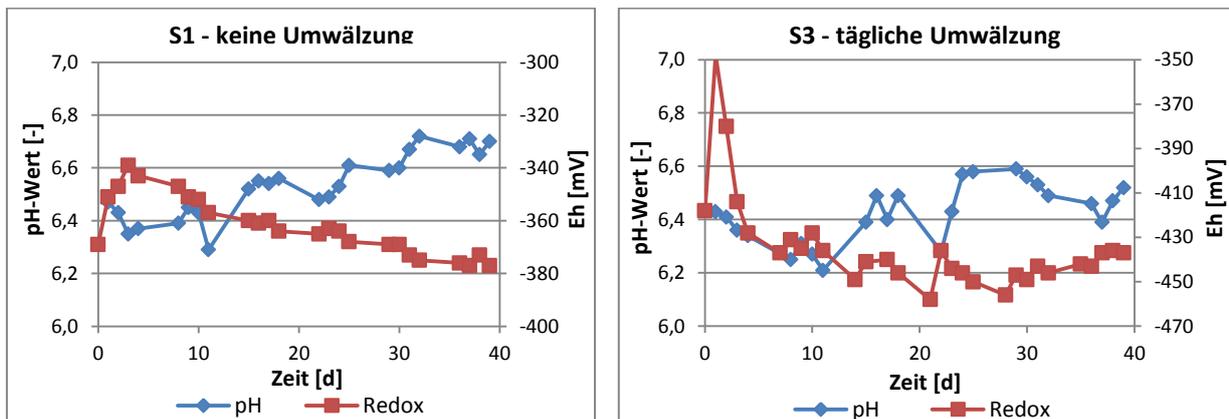


Abb. 8: Verlauf von pH-Wert und Redoxpotential beim Reaktor **ohne Sandbettumwälzung** (links) und mit **täglicher Sandbettumwälzung** (rechts)

Im Bioreaktor ohne Sandbettumwälzung ist, abgesehen von den ersten 10 Tagen, eine steigende Tendenz bei den pH-Werten und eine kontinuierliche Abnahme des Redoxpotentials zu erkennen. Dies kann möglicherweise auf eine sich mit der Zeit verbessernde Aktivität der sulfatreduzierenden Mikroorganismen hindeuten. Im Reaktor mit täglicher Sandbettumwälzung sind die beschriebenen Tendenzen deutlich schwächer ausgeprägt. Das Redoxpotential liegt, abgesehen von der Anfangsphase, immer in einem engen Bereich (zwischen -435 und -458 mV), der aber deutlich niedriger ist, als im Reaktor ohne Sandbettumwälzung. Die pH-Werte lagen im betrachteten Versuchszeitraum im Bereich von pH 6,21 — 6,74.

Die bereits im Versuch zum Einfluss der Sandbettumwälzung beobachtete starke Gasbildung hielt in den 39 Tagen weiterhin an und konnte besonders im Reaktor mit täglicher Umwälzung beobachtet werden.

Im Rahmen dieses Versuchs wurde eine studentische Studienarbeit erfolgreich abgeschlossen.

### 3.4. Erstellung einer 16S rRNA Genfragment Bibliothek für Archaeen

Aufgrund der in den bisherigen Reaktorversuchen gemachten Beobachtungen, dass in bestimmten Versuchsphasen größere Mengen an Gas gebildet werden und des anschließenden analytischen Nachweises von Methan in der Gasphase, war davon auszugehen, dass ein Teil der mikrobiellen Gemeinschaft methanogene Archaeen bilden. Archaeen bilden neben den Bakterien die zweite Gruppe prokaryotischer Mikroorganismen. Diese stellen, je nach verwendeten Elektronendonator eine Konkurrenz für die erwünschten sulfatreduzierenden Mikroorganismen dar.

Im Rahmen einer studentischen Masterarbeit sollte daher eine Analyse der in den Bioreaktoren vorkommenden methanbildenden Mikroorganismen erfolgen. Ein Standardverfahren zur Analyse komplexer mikrobieller Gemeinschaften ist die Erstellung einer Klonbibliothek von mittels PCR amplifizierter 16S rRNA Genfragmente mit anschließender Nukleotidsequenz-Analyse ausgewählter Klone. Bei den Vorbereitungen zur Erstellung der Klonbibliothek, insbesondere der PCR-Amplifizierung der 16S rRNA Gene, hat sich gezeigt, dass in der Regel nur eine geringe Anzahl Archaeen und damit potentieller Methanbildner in den Reaktoren zu finden ist. Eine Ausnahme bilden die Phasen erhöhter Gasbildung, die kurzzeitig im Reaktorversuch zum Einfluss der hydraulischen Aufenthaltszeit und auch im Versuch zum Einfluss der Sandbettumwälzung aufgetreten sind. Nur während dieser Phase war es letztendlich möglich, die 16S rRNA Genfragmente von Archaeen zu amplifizieren. Dies deutet darauf hin, dass nur in diesen Situationen eine höhere Anzahl Archaeen im Biofilm vorhanden waren.

Parallel zu dieser als konventionell zu betrachtenden Herangehensweise wurde eine neue Hochdurchsatz-Sequenziermethode (Pyrosequenzierung) zur Analyse der 16S rRNA Genfragmente herangezogen. Diese als 16S-tag Pyrosequenzierung bekannte Methode umgeht die durch Klonierung möglicherweise bedingte Verzerrung in den Ergebnissen bezüglich der quantitativen Zusammensetzung der mikrobiellen Diversität. Zusätzlich erlaubt die 16S-tag Pyrosequenzierung die Analyse mehrerer Proben, da die Kosten für die Sequenzierung im Vergleich zur konventionellen Herangehensweise (Sanger-Sequenzierung) wesentlich geringer sind.

Bei den abschließenden Analysen zeigte sich, dass bei den methanbildenden Archaeen ein Großteil der erhaltenen Sequenzdaten der Gattung *Methanosarcina* zugeordnet werden können. Die Analysen zeitlich aufeinanderfolgender Proben (Ende Batchphase, Mitte und Ende der kontinuierlichen Phase) aus einem Bioreaktorversuch zeigte ebenfalls, dass *Methanosarcina* über den gesamten Versuchszeitraum die dominierende Archaeen Gattung darstellt. Ein geringer Grad an Sequenzvariationen deutet auf eine gewisse Mikrodiversität innerhalb der Gattung hin. *Methanosarcina* sp. zählen zu den acetoclastischen Methanogenen und können Methanol,  $H_2/CO_2$  oder Acetat als Substrat für die Bildung von Methan nutzen. Da für die Bioreaktorversuche Methanol als Elektronendonator für die biologische Sulfatreduktion eingesetzt worden ist, stehen die nachgewiesenen *Methanosarcina* Spezies in direkter Konkurrenz mit den vorhandenen Sulfatreduzieren. Beim Vergleich der konventionellen Methode der Klonbibliothek mit der Pyrosequenzierung zeigte sich, dass mit letzterer nicht nur vergleichbare Ergebnisse erhalten wurden, sondern dass gleichzeitig weitere Spezies gefunden werden konnten. Die Analyse der Sequenzdaten mittels der SILVA-Webseite zeigte die Ähnlichkeit von 10 Sequenzen mit der Ordnung *Methanomicrobiales*, eine Sequenz mit der Gattung *Methanocellum*, zwei Sequenzen mit

*Methanogenium* und sieben Sequenzen Ähnlichkeit mit *Methanomicrobium*. Diese waren in der konventionell erstellten Analyse nicht detektiert worden.

Parallel zur Untersuchung der Archaeen Population erfolgte weiterhin die Untersuchung der bakteriellen Diversität von 3 aufeinanderfolgenden Proben aus einem Bioreaktorversuch mit der Pyrosequenzierung Methode. Es zeigten sich deutliche qualitative und quantitative Veränderungen der bakteriellen Population beim Wechsel von der Batch- zur kontinuierlichen Phase. Spezies, die während der Batchphase dominierten, waren während der kontinuierlichen Phase nur noch mit einem geringen Anteil vorhanden. Manche Spezies wurden nicht mehr detektiert. Beim Vergleich der Ergebnisse der Pyrosequenzierung mit denen der konventionellen Methode (Klonbibliothek) zeigte sich ein ähnliches Ergebnis wie bereits bei den Archaeen. Mit Hilfe der Pyrosequenzierung konnten zusätzliche Spezies detektiert werden, die vorher mittels Klonbibliothek nicht nachgewiesen werden konnten.

### 3.5 Effizienz unterschiedlicher Elektronendonatoren für die Sulfatreduktion

In den bisherigen Versuchen konnte zwar die biologische Sulfatreduktion in den Bioreaktoren mit bewegtem Sandbett erfolgreich etabliert und eingesetzt werden. Trotzdem waren die erreichten Sulfatreduktionsraten noch nicht befriedigend. Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass der bisher verwendete Elektronendonator Methanol möglicherweise nicht das optimale Substrat für den Einsatz in Bioreaktoren, mit einer komplexen mikrobiellen Gemeinschaft, darstellt. Gründe dafür sind u.a.:

- die bereits weiter oben erwähnte Konkurrenzsituation um den vorhandenen Elektronendonator (Methanogene, Fermentierer)
- daraus folgende mögliche ineffiziente Nutzung des Substrates für die biologische Sulfatreduktion

Aus der wissenschaftlichen Literatur ist bekannt, dass Sulfatreduzierer eine Vielzahl an organischen Substanzen als Kohlenstoff- bzw. Energiequelle nutzen können. Weiterhin werden nur wenige SRB-Spezies beschrieben die mit Methanol als alleiniger C-Quelle wachsen können. Aus diesen genannten Gründen ist ein Versuch mit alternativen Elektronendonatoren gestartet worden, um deren Effektivität hinsichtlich der biologischen Sulfatreduktion im Vergleich zu Methanol zu verifizieren.

Als Vergleichssubstanzen sind Lactat, Glycerin, Ethanol und Zuckerrübensirup (als Melasse bezeichnet) ausgewählt worden. Zusätzlich ist in einer weiteren Säule eine Mischung aus Methanol und Lactat eingesetzt worden, da einerseits in der Literatur die gute Verwertbarkeit von Lactat durch Sulfatreduzierer beschrieben ist, und andererseits ausgeführt wird, dass bei der Verwertung von Methanol in manchen Fällen eine zusätzliche C-Quelle (in diesem Fall Lactat) notwendig sei.

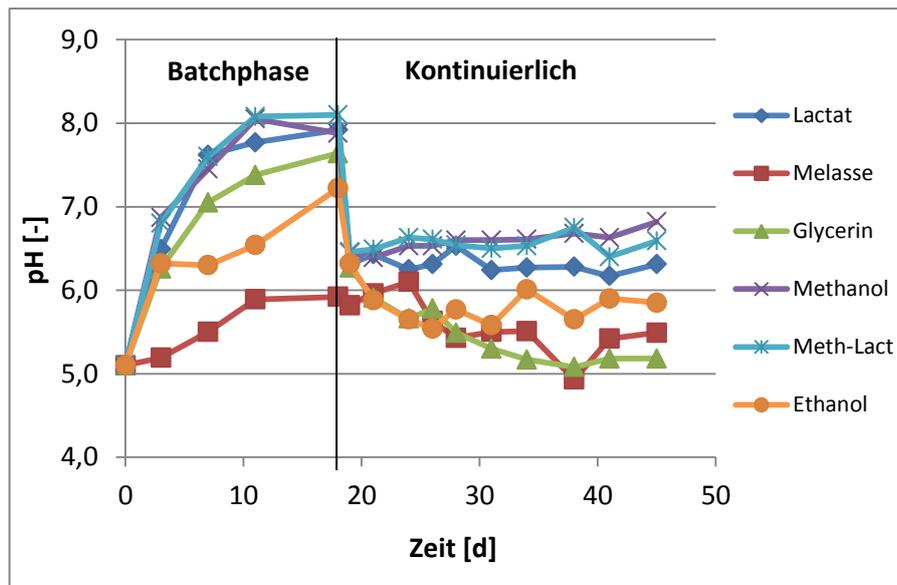
Für den ersten Versuchsdurchgang sind jeweils 6 kleine Festbettsäulen mit den Abmessungen 30 cm x 9 cm (Länge, Durchmesser) verwendet worden (siehe Abb.9). Diese waren mit dem gleichen Sandmaterial als Aufwuchsträger gefüllt, wie auch die größeren Bioreaktoren. Auf einem Teil des Sandes erfolgte bereits im Vorfeld die Anreicherung eines sulfatreduzierenden Biofilmes aus Kippengrundwasserproben vom Braunkohlentagebau Nochten.



*Abb.9: Festbettsäulen während der Befüllung (links) und vollständig befüllt in Betrieb (rechts)*

Der Versuch war wieder in eine Startphase (Dauer 17 Tage) und eine kontinuierliche Betriebsphase (Dauer 30 Tage) unterteilt, wobei die erste als „Bewuchsphase“ zur Ausbildung eines ausreichenden Biofilmes auf dem kompletten Sandbett in den Säulen dienen sollte.

Bereits während der anfänglichen Batchphase wurden erste Unterschiede zwischen den einzelnen Ansätzen mit den verschiedenen Elektronendonatoren deutlich (siehe Abb.10). Während z.B. in der Säule mit Lactat am Ende der Batchphase ein pH-Wert von 8,1 erreicht werden konnte, stieg dieser bei Glycerin auf 7,6 oder bei Melasse nur auf 5,9. Melasse bildet hierbei, wie sich erst später im Versuchsverlauf herausstellte, eine Sonderrolle, da es bei Zugabe zu der verwendeten Nährlösung zu einem starkem Absinken des pH-Wertes bis unter 4 führt. Möglicherweise liegt die Ursache in der Aufbewahrung der vorher nicht sterilisierten Nährlösung über meistens 2 oder 3 Tage bei Raumtemperatur, was möglicherweise bestimmte mikrobielle Gärvorgänge in der Vorratslösung initiierte und zu dem niedrigen pH-Wert führte.

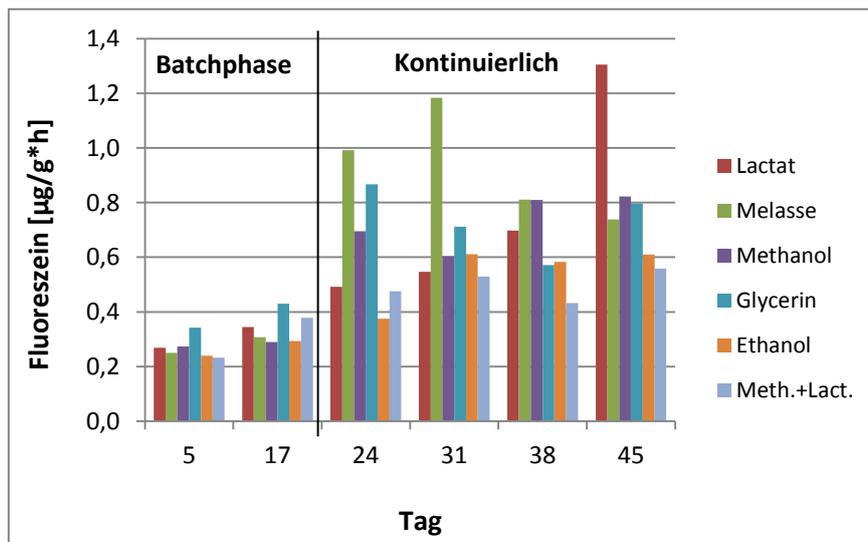


*Abb.10: Verlauf der pH-Werte im Ablauf der einzelnen Säulen mit unterschiedlichen Elektronendonatoren während der Batch- bzw. Kontinuierlichen Phase*

Aufgrund der unterschiedlichen pH-Werte der einzelnen Nährlösungen für die jeweiligen Säulen ergab sich eine Schwierigkeit bei der Interpretation der Messergebnisse des

Versuches. So kann z.B. nicht eindeutig gesagt werden, ob die Unterschiede bei den pH-Werten in den Säulen während der kontinuierlichen Phase (siehe Abb.10) auf den Ausgangs-pH-Wert der einzelnen Nährlösungen zurückzuführen sind oder ob dies ein Effekt der unterschiedlichen verwendeten Elektronendonatoren ist. So können sich Unterschiede zwischen den pH-Werten der Lösungen in den einzelnen Säulen auch aus den ablaufenden biochemischen Reaktionen ergeben. Es ist z.B. bekannt, dass Ethanol durch anaerobe Mikroorganismen in einer ersten Reaktion bevorzugt zu Essigsäure abgebaut wird und erst in einer zweiten Reaktion Hydrogencarbonat als puffernde Substanz erzeugt wird. Fehlen aber acetatoxidierende Sulfatreduzierer im Biofilm, kommt es zu einer Anreicherung von Essigsäure in der Säule, was wiederum zu einem Sinken des pH-Wertes führen kann. Weiterhin ist die erzeugte Hydrogencarbonatmenge je nach eingesetztem Elektronendonator unterschiedlich hoch. So werden z.B. bei der kompletten Oxidation von Lactat 3 mol Bicarbonat-Alkalinität pro 1 mol Substrat gebildet, während dies bei Ethanol nur 2 mol Bicarbonat-Alkalinität sind.

Die Wahl des Elektronendonators beeinflusst auch das Konkurrenzverhältnis zwischen unterschiedlichen mikrobiellen Gruppen, im speziellen den Sulfatreduzieren, methanogenen Archaeen und acetogenen Mikroorganismen. Indizien dafür sind z.B. die gemessenen Gesamtaktivitäten in den einzelnen Säulen (siehe Abb.11) oder der unterschiedliche Grad der Gasbildung.



*Abb.11: Werte der Gesamtaktivitätsbestimmung in den einzelnen Säulen mit unterschiedlichen Elektronendonatoren während der Batch- und der kontinuierlichen Phase*

Die beobachtete Gasbildung trat besonders bei den Substraten Melasse, Lactat und Glycerin auf, was ein Hinweis darauf sein kann, dass diese Substrate unter den gewählten Bedingungen möglicherweise bevorzugt von fermentierenden oder methanogenen Mikroorganismen abgebaut worden sind. In den Säulen mit Methanol und Methanol-Lactat konnte diese starke Gasblasenbildung im Sandbett nicht in dem Umfang beobachtet werden.

Weitere Differenzierungen zwischen den Elektronendonatoren zeigten sich bei der optischen Betrachtung der Menge an schwarzen Metallsulfidausfällungen in den einzelnen Säulen. Diese schienen in den Säulen mit Methanol und Methanol-Lactat am größten zu sein,

während in der Säule mit Melasse nur eine sehr geringe bis gar keine Schwarzfärbung auf dem hellen Sandmaterial zu erkennen war.

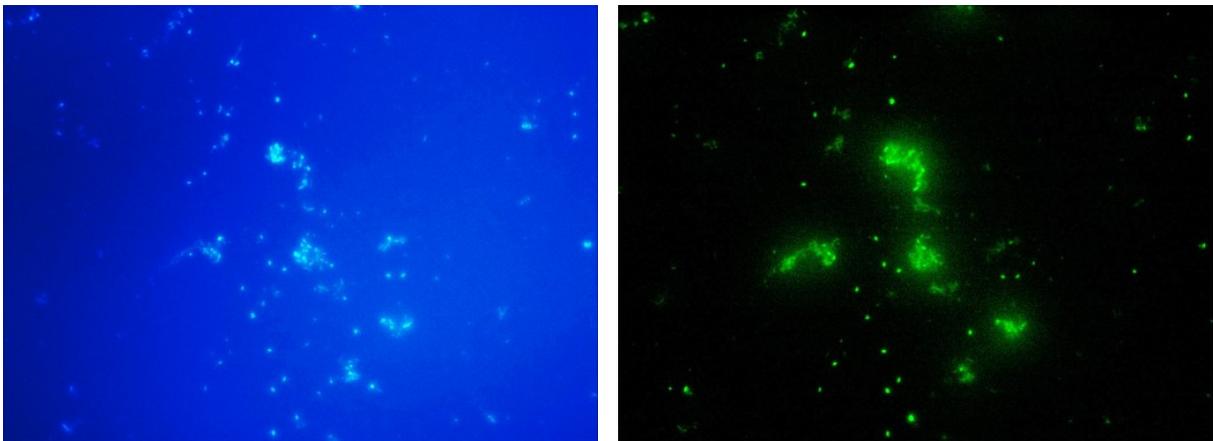
Die Auswertung des Versuches ist noch nicht abgeschlossen, da noch nicht alle notwendigen Analysen beendet worden sind. Ein noch durchzuführender zweiter vergleichbarer Versuch soll zeigen, ob die Ergebnisse des ersten Substratversuches reproduzierbar sind.

### **3.6 Quantitative Untersuchung der Diversität der mikrobiellen Gemeinschaft**

#### **i) FISH (Fluorescence In Situ hybridization)**

Für die Bestimmung der quantitativen Anteile von z.B. sulfatreduzierenden oder methanproduzierenden Spezies können fluoreszierende Farbstoffe bzw. DNA-Sonden verwendet werden.

In Abbildung 12 ist ein Beispiel dafür dargestellt. Im linken Mikroskopbild sind alle in der Probe vorhandenen Zellen mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes DAPI blau gefärbt. Im rechten Bild dagegen nur bestimmte sulfatreduzierende Spezies mit Hilfe einer grün fluoreszierenden DNA-Sonde (SRB 385), welche sich spezifisch an die ribosomalen RNA-Moleküle von sulfatreduzierenden Mikroorganismen anlagert. Die Spezifität dieser Hybridisierungstechnik (fluorescence *in situ* hybridisation – FISH) wird hierbei durch die Nukleotidsequenz der Sonde genau eingestellten experimentellen Bedingungen erreicht.



**Abb. 12:** Darstellung der Biomasse aus einem Bioreaktor mittels Fluoreszenzmarkierung – Links: blaue DNA-Markierung zur Darstellung aller mikrobiellen Zellen (Gesamtanzahl). Rechts: spezifische Markierung der sulfatreduzierenden Spezies mittels fluoreszierender DNA-Sonden, welche nur an die 16S ribosomale RNA von sulfatreduzierenden Spezies binden.

Für diese Methode sind noch Optimierungsarbeiten durchzuführen, um für die entsprechenden Sonden z.B. für Sulfatreduzierer die jeweiligen optimalen Prozessbedingungen für eine aussagekräftige mikroskopische Darstellung zu erhalten und Fehlinterpretationen zu vermeiden.

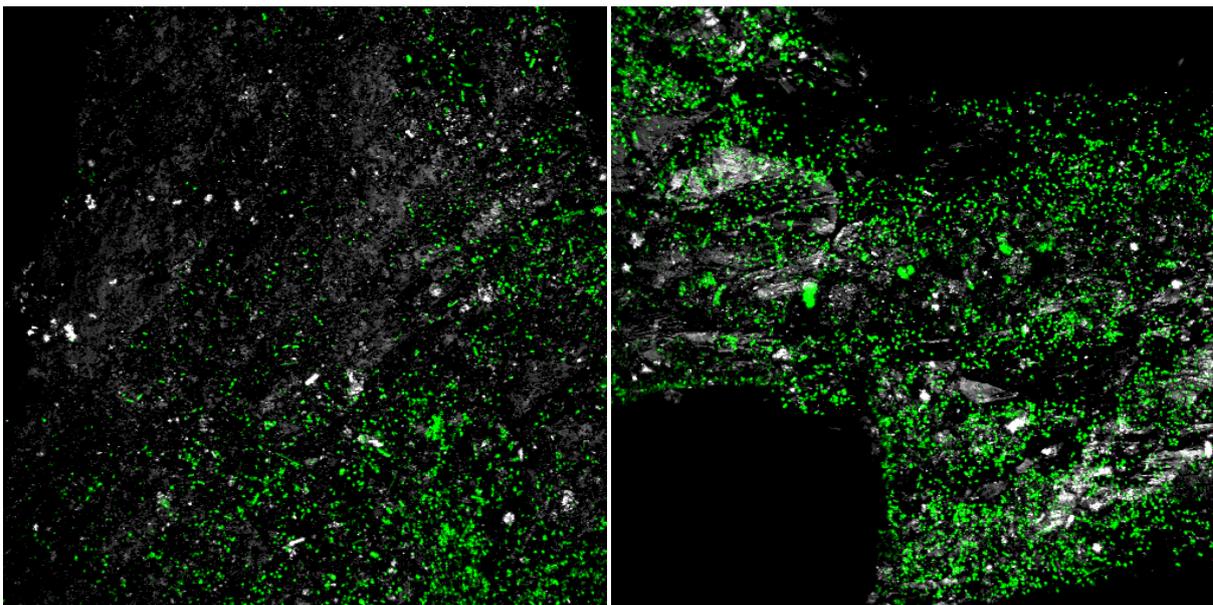
#### **ii) Konfokale Laser Scanning Mikroskopie (CLSM)**

Für die bisherigen bildlichen Darstellungen der Mikroorganismen im Biofilm der Reaktoren mittels fluoreszierender DNA-Sonden, war es notwendig, den Biofilm z.B. mit Hilfe einer

Ultraschallbehandlung von den Sandkörnern zu lösen, da das in unserem Labor befindliche Fluoreszenzmikroskop nicht die Betrachtung dreidimensionaler Körper (z.B. Sandkörner) erlaubt. Somit ist es bisher nicht möglich gewesen den Biofilm direkt auf dem Trägermaterial Sand, sondern nur indirekt nachzuweisen (z.B. das Vorkommen von Mikroorganismen in entsprechenden Proben mittels molekularbiologischer oder mit Hilfe der Bestimmung der Proteinmenge).

Eine Möglichkeit der direkten Betrachtung bietet die konfokale Laser Scanning Mikroskopie (confocal Laser Scanning microscope - CLSM), welches die Mikroskopie in verschiedenen Fokusebenen (also entlang der Z-Achse) ermöglicht. Hierfür wurden die mikrobiellen Zellen direkt auf den Sandkörnern fixiert und mit einem Fluoreszenzfarbstoff, welche die DNA aller Zellen färbt, markiert. Mit Hilfe des CLSM wurden anschließend mehrere Einzelaufnahmen in Fokusebenen von 1  $\mu\text{m}$  Abstand entlang der z-Achse aufgenommen und Computer-gestützt zu einem einzigen Bild zusammengesetzt.

Erste Testmessungen zur Überprüfung der Anwendbarkeit dieser Untersuchungsmethode bei dem von uns verwendeten Sandmaterial sind am Umweltforschungszentrum (UFZ) in Magdeburg durchgeführt worden (Dr. Thomas Neu). Dabei konnte der auf den Sandkörnern befindliche, mit einem grünen Fluoreszenzfarbstoff angefärbte Biofilm sehr gut erkennbar dargestellt werden (siehe Abb.13).



*Abb.13: Darstellung des Biofilmes (grün) auf einem Sandkorn mittels Konfokaler Laser Scanning Mikroskopie, entnommen aus einem sulfatreduzierenden Bioreaktor. Die Aufnahmen sind ein Gesamtbild aus 31 (links) bzw. 48 Einzelaufnahmen (rechts), welche im Abstand von je einem  $\mu\text{m}$  aufgenommen wurden.*

Als sinnvoll werden weitere Untersuchungen mit spezifischen Fluoreszenzsonden zur Darstellung der räumlichen Verteilung von sulfatreduzierenden- und anderen Mikroorganismen auf dem Trägermaterial Sand erachtet. Diese können dann Aufschluss über die mögliche Rolle von Symbiosen zwischen Sulfatreduzieren und anderen funktionellen Gruppen von Mikroorganismen geben, wie sie bereits im Abschnitt zum Versuch der Sandbettumwälzung erwähnt worden sind.

### **3.7 Sonstiges**

Aus den Ideen, die bisher im Rahmen dieser Arbeit entstanden sind, konnten 4 Erfindungsmeldungen an der Universität eingereicht und an den Projektpartner SIEMENS weitergereicht werden. Aus den Erfindungsmeldungen wird zurzeit eine entsprechende Patentschrift zur Anmeldung vorbereitet.