



Universität Hamburg

Optimierung der Gewinnung von extrazellulären
polymeren Substanzen von
Laugungsbakterien

Diplomarbeit

von

Pamela Lazar

Universität Hamburg

Biozentrum Klein Flottbek und Botanischer Garten

Abteilung Mikrobiologie

Dezember 2004

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	5
1. ZUSAMMENFASSUNG	1
2. EINLEITUNG	3
ACIDITHIOBACILLUS FERROOXIDANS	4
LAUGUNGSMECHANISMEN	5
ANHEFTUNG UND BIOFILMBILDUNG	7
DETERGENZIEN	11
ZIEL DER ARBEIT	13
3 MATERIAL UND METHODEN	14
3.1 BAKTERIEN	14
3.2 NÄHRMEDIEN	14
3.3 SUBSTRATUM	15
3.4 DETERGENZIEN	16
3.5 KULTURFÜHRUNG	17
3.5.1 STAMMKULTUREN	17
3.5.2 ZWISCHENKULTUREN	18
3.5.3 MASSEANZUCHTEN	18
3.5.4 ANZUCHT AUF PYRIT	18
3.5.5 REINHEITSKONTROLLEN	19
3.6 QUANTIFIZIERUNG DER BAKTERIENANHEFTUNG	19
3.7 ABLÖSUNG SESSILER ZELLEN VON PYRIT	20
3.8 EXTRAZELLULÄRE, POLYMERE SUBSTANZEN –EPS–	21
3.8.1 ISOLIERUNG	21
3.8.2 REINIGUNG	21
3.8.3 NACHWEIS	21
3.9 ANALYTISCHE NACHWEISVERFAHREN	22
3.9.1 ZELLZAHLEN	22
3.9.2 PH	22
3.9.3 EISEN-II- UND III-IONEN	22
3.9.4 2-KETO-3-DESOXYOCTONAT –KDO–	23

3.9.5	KOHLHYDRATE	23
4.	ERGEBNISSE	24
4.1	OXIDATIONSRATE VON PYRIT	24
4.2	ANHEFTUNG AN PYRIT	25
4.3	ABLÖSUNG SESSILER ZELLEN VON PYRIT	29
4.3.1	BEDEUTUNG DER KONZENTRATION UND EINWIRKZEIT VON DETERGENZIEN	29
4.3.1.1	BEDEUTUNG DER EINWIRKZEIT BEI DER ABLÖSUNG VON ZELLEN VON <i>A. FERROOXIDANS</i> VOM PYRIT	31
4.3.1.2	BEDEUTUNG DER HOMOGENISIERUNGSDAUER	32
4.3.1.3	BEDEUTUNG DER DETERGENSKONZENTRATION	33
4.3.1.4	KOMBINATION VON LANGER HOMOGENISIERUNGSZEIT UND HOHER DERTERGENSKONZENTRATION	34
4.3.2	EFFEKT VON EISEN-II-IONEN	35
4.3.3	ABLÖSUNGEN DER ZELLEN IN 1 L-KOLBEN	38
4.3.4	ABLÖSUNG VON ZELLEN DES STAMMES <i>A. FERROOXIDANS</i> A2 VON PYRIT	39
4.3.5	WIRKUNG VON DITHERYTHRIT AUF DIE ZELLABLÖSUNG	40
4.4	GEWINNUNG VON EPS	41
4.4.1	BEDEUTUNG DER EINWIRKZEIT BEI DER GEWINNUNG VON EPS DER ZELLEN VON <i>A.</i> <i>FERROOXIDANS</i>	42
4.4.2	EFFEKT VON EISEN-II-IONEN BEI DER GEWINNUNG VON EPS	43
4.4.3	EFFEKT DER KONZENTRATION VON DETERGENZEN AUF GEWINNUNG VON EPS	44
5.	DISKUSSION	53
	ZELLANHEFTUNG	53
	EPS-GEWINNUNG	59
6.	LITERATURVERZEICHNIS	56

Abkürzungsverzeichnis

A. deion.	Aqua deionisata
A. dest.	Aqua destilata
Abb.	Abbildung
AFM	Atomic Force Microscopy
ATCC	American Type Culture Collection
°C	Grad Celsius
CFU	Colony Fotming Units, Koloniebildende Einheiten
d	Tag
Da	Dalton
DEV	Deutsches Einheitsverfahren
DSM	Deutsche Stammsammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen
DTT	Dithiotreithol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EPS	extrazelluläre, polymere Substanzen
et al.	et altera
Fe	Eisen
g	Gramm
*g	Vielfaches der Erdbeschleunigung
h	Stunde
k...	kilo...
KDO	2-Keto-3-Desoxyoctonat
konz.	konzentriert
L	Liter
log	Logarithmus
M	Molarität
m	Meter
m...	Milli...
min	Minute
N	Normalität
n...	Nano...
NaOH	Natronlauge
OD	optische Dichte

pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
<i>S.</i>	<i>Sulfolobus</i>
S	Schwefel
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
<i>spec.</i>	species
<i>T.</i>	<i>Thiobacillus</i>
TG	Trockengewicht
Tris	Tris(hydroxymethyl-)aminomethan
Upm	Umdrehungen pro Minute
v	Volumen
w	Gewicht
μ...	mikro...
%	Prozent

1. Zusammenfassung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, eine Methode zur quantitativen Ablösung sessiler Zellen zur maximalen EPS-Gewinnung zu finden. Nach Vorversuchen zur Bestimmung von Pyritoxidationsraten und zur Anheftung wurden in der vorliegenden Arbeit die vier Detergenzien Zwittergent, Tween 20, Tween 80 und Triton X-100 auf maximale Wirkung bei der Ablösung und EPS-Gewinnung von an Pyrit angehefteten Zellen von *Acidithiobacillus ferrooxidans* unter verschiedenen Bedingungen vergleichend getestet.

- Innerhalb der ersten 2,5 min heften 32% des Inokulums (3×10^{10} Zellen pro g Pyrit) der Zellen von *A. ferrooxidans* Stamm R1 an das Pyrit an. Der Prozess der Anheftung stagniert nach 24h Versuchsdauer und nach 52h nimmt die Zahl der planktonischen Zellen wieder zu.
- Die Pyritoxidationsraten der beiden Stämme R1 und A2 unterscheiden sich mit $8,2 \times 10^{-7}$ ng Pyrit pro Tag und Zelle bzw. $7,2 \times 10^{-7}$ ng Pyrit pro Tag und Zelle nicht signifikant voneinander. Allerdings können die Zellen des Stammes R1 in 100 mL-Kolben Pyrit schneller als in 1L-Ansätzen oxidieren.
- Bezüglich der Ablösung der Zellen zeigten die vier Detergenzien nach unterschiedlich langer Behandlung von bewachsenem Pyrit (15 bis 60 min) keinen Unterschied in ihrer Wirkung.
- Eine Erhöhung der Homogenisierungsdauer von 3 min auf 10 min führt zu einer Erhöhung der Anzahl abgelöster Zellen um einen Faktor von 10 bei allen Detergenzien
- Eine Zugabe von Eisen(II)-Ionen zu den vier Detergenzien hat keinen Einfluss auf die Anzahl abgelöster Zellen.
- Durch eine Erhöhung der Konzentration an Detergenz kann eine Steigerung der Anzahl an abgelösten Zellen von Pyrit um einen Mindestfaktor von 10 bei Zwittergent und Triton X-100, um einen Höchsfaktor von 17 bei Tween 80 und um einen Faktor von 12 bei Tween 20 erreicht werden.
- Das beste Detergenz für die Zellablösung ist Tween 20 bei einer Konzentration von 1,5% und einer Homogenisierungsdauer von 3 min.

- Die Menge an gewinnbaren EPS – bezogen auf 10^{10} Zellen pro mL– erhöht sich um das mindestens 1,9fache durch die Verlängerung der Einwirkzeit der vier Detergenzien.
- Eine Kombination von Eisen(II)-Ionen mit Zwittergent oder Tween 20 erhöhte den Ertrag an EPS bei Zwittergent um einen Faktor von 21 und bei Tween 20 um einen Faktor von 11.
- Die Erhöhung der Konzentration der vier Detergenzien bewirkte auch eine Erhöhung der gewonnenen EPS-Menge – bezogen auf 10^{10} Zellen pro mL–um einen Faktor von 8.
- Die Zahl der abgelösten Zellen korreliert nicht mit der gewinnbaren EPS-Menge. Offensichtlich werden die EPS nur partiell abgelöst.
- Die besten Ergebnisse für die EPS-Gewinnung erbrachte ein Zwittergent-Zusatz (0,001%) mit Zugabe von Eisen(II)-Ionen (Endkonzentration 0,03%) bei einer Homogenisierungsdauer von 3 min.

2. Einleitung

Eisen ist neben Schwefel eines der häufigsten Elemente der Erdkruste. Eisen kommt hauptsächlich in den Oxidationszuständen +II und +III vor und bewegt sich in der Natur zwischen diesen Zuständen hin und her. Eisen ist ein Produkt menschlicher Aktivität und entsteht durch Verhütten von zwei- oder dreiwertigen Eisenerzen zu Gusseisen. Bei Schwefel ist eine Vielzahl von Oxidationszuständen möglich. Aber nur in den Oxidationsstufen –II, 0 und +VI kommen signifikante Schwefelmengen in der Natur vor.

Zur Oxidation von Eisen- und Schwefelverbindungen in der Natur sind verschiedene Mikroorganismen hauptsächlich aus der Gruppe der Bacteria und einige aus dem Reich der Archeae befähigt. Bei den Archeae sind Gattungen wie *Sulfolobus* und *Acidianus* als Eisen- und Schwefeloxidanten bekannt. Arten wie *Acidianus brierleyi* und *Sulfolobus acidocaldarius* sind zur Oxidation von Schwefel befähigt, einige Arten sind zusätzlich in der Lage, Eisen(II)-Ionen zu oxidieren. Zu den Bakterien, die Eisen- und Schwefelverbindungen oxidieren, gehört die im Reich der Bakterien wohl physiologisch vielfältigste Bakteriengruppe, die Proteobakterien (Hallmann et al. 1993, Lane et al. 1992, Kelly und Wood 2000). Die Oxidation von Eisen(II)-Ionen erfolgt meist bei einem pH unter 4. Bei dieser Oxidation wird wenig Energie frei, weshalb selbst eine kleine Zahl an Bakterienzellen für das Ausfällen großer Eisenmengen verantwortlich sein kann (Martinko, Madigan, 2000). In nichtsauren Biotopen können Eisen-II-Ionen von Eisenbakterien wie *Leptothrix* und *Gallionella* oxidiert werden. Die erstgenannte Gruppe wächst neutrophil und phototroph. Unter der letztgenannten Gruppe befinden sich sehr viele obligate Schwefeloxidanten. In die Gruppe der schwefeloxidierenden Bakterien gehören die phototrophen Purpurbakterien wie die Schwefelpurpurbakterien mit den Gattungen *Ectiothiorhodospira* und *Halorhodospira* oder die Gattung der *Rhodospirilla*, welche zu den Nichtschwefel-Purpurbakterien gehört (Martinko, Madigan, Brock, 2000).

Zu der Gruppe der Eisenionen und/oder Schwefel oxidierenden Bakterien gehören die obligat aeroben, acidophilen, chemolithotrophen Gattungen *Acidithiobacillus*, *Leptospirillum*, *Halothiobacillus*, und *Thermithiobacillus* (Kelly und Wood, 2000). Innerhalb dieser Gattungen ist nur die Art *Acidithiobacillus ferrooxidans* (*A. ferrooxidans*) zu Oxidation von sowohl Eisen(II)-Ionen als auch Schwefelverbindungen befähigt. In die gleiche Gattung gehört außerdem die Art *Acidithiobacillus thiooxidans*, der nur Schwefelverbindungen

oxidieren kann. Eine Art der Gattung *Leptospirillum*, die nur Eisen(II)-Ionen als einzige Energiequelle nutzt, ist *Leptospirillum ferrooxidans*.

Acidithiobacillus ferrooxidans

Die Bakterienart *A. ferrooxidans* wurde erstmals von Colmer und Mitarbeitern 1947 in den sauren Abwässern einer Kohlemine entdeckt und 1951 von Colmer und Temple unter dem Namen *Thiobacillus ferrooxidans* (*T. ferrooxidans*) beschrieben (Colmer und Hinkle 1947, Colmer et al. 1950, Colmer und Temple 1951). Kelly und Wood (2000) haben basierend auf 16S rRNA-Untersuchungen *T. ferrooxidans* in die neue Gattung *Acidithiobacillus* eingeordnet. Die Art *A. ferrooxidans* wurde aufgrund physiologischer Untersuchungen durch Lane et al. (1992) phylogenetisch in die β -Untergruppe der Proteobakterien eingeordnet, während *Leptospirillum ferrooxidans* (*L. ferrooxidans*) eine eigene Untergruppe mit anderen Bakterien bildet (Ehrlich et al 1995). Inzwischen wurde die Art *A. ferrooxidans*, ebenfalls durch Kelly und Wood (2000), in die γ -Untergruppe der Proteobakterien eingeordnet. Die Unterteilung der Proteobakterien in vier Untergruppen wurde von Stackebrandt (1988) etabliert. Diese Unterteilung erfolgte anhand der Untersuchungen der 5S und 16S rDNA der Bakterien. Die eisen(II)-ionen- und schwefeloxidierenden Bakterien wurden in die α -, β - bzw. γ -Untergruppe eingeordnet. Die Art *Acidithiobacillus ferrooxidans* (*A. ferrooxidans*) ist eine genetisch sehr heterogene Gruppe (Harrison 1982, Lane et al. 1992, Mitchell 2002) und beherbergt Stämme wie R1, A2 und C52.

Die Rolle von *A. ferrooxidans* bei der Säureproduktion aus Pyrit wurde 1953 durch Leathen et al. beschrieben. Weiterhin ist die Bedeutung dieses Organismus für die Solubilisierung von Kupfer bekannt (Beck 1967, Duncan et al. 1964). Auch wirtschaftlich erweckte das Bakterium das Interesse der Forscher: Die Volatilisation von Quecksilber-Bestandteilen aus einer Lösung (Olson et al. 1980), die Möglichkeit der Dekontamination von Industrie-Abwasser (Ebner 1978) und die kommerzielle Laugung von Kupfer (Brierley 1978) aus minderwertigem Erz sind einige der Forschungsschwerpunkte mit diesem Bakterium gewesen.

Die Bakterien der Art *A. ferrooxidans* sind obligat acidophile, aerobe, Gram-negative Stäbchen von 0,5 μm Dicke und 1-3 μm Länge mit polarer Begeißelung (Hensley und Forlifer, 1994, Kelly und Wood, 2000). Dauerformen wurden bisher nicht beobachtet. Die Bakterien wachsen unter aeroben Bedingungen bei einem pH-Optimum von 2. Die

Energiegewinnung erfolgt über die Oxidation von Eisen(II)-Ionen, Elementarschwefel und anderen Schwefelverbindungen wie Sulfid, Thiosulfat, Polythionat oder Metallsulfiden (Zenneck, 1988, Jensen und Webb 1995). Auch wurde die Nutzung von H₂ als Energiequelle beschrieben (Drobner 1990). Die Stoffwechselprodukte sind Schwefelsäure, Eisen(III)-Ionen und andere Schwermetallionen, die aus der Oxidation von Metallsulfiden stammen.

A. ferrooxidans ist in der Lage, verschiedene Metallsulfide wie Pyrit (FeS₂), Chalkopyrit (CuFeS₂), Sphalerit (ZnS), Arsenopyrit (FeAsS), Galena (PbS), Chalkosin (Cu₂S), , Covellin (CuS) und Kobaltsulfid (CoS) zu oxidieren (Silverman und Ehrlich 1964, Ehrlich 2002). Des Weiteren zeichnen sich diese Zellen durch eine hohe Schwermetalltoleranz aus, was sie zum Überleben in schwermetallbelasteten Laugungsbiotopen befähigt (Tuovinen et al. 1971, Rehm 1980, Hallmann et al. 1993).

Die CO₂-Fixierung für zellulären Kohlenstoff erfolgt über den Calvin-Cyklus (DiSpirito und Tuovinen 1982). Einige Stämme sind sogar zur Fixierung von Stickstoff befähigt (Mackintosh 1978, Stevens et al. 1986).

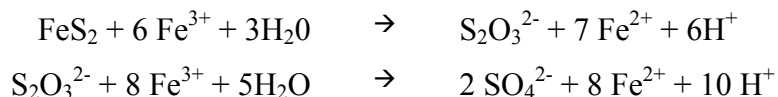
Laugungsmechanismen

Die bakterielle Laugung ist die Biooxidation von Metallsulfiden zu löslichen Metallsulfaten und wird durch spezielle Bakterien herbeigeführt (Sand et al. 1998). *A. ferrooxidans* spielt daher eine wichtige Rolle bei der industriellen Armerzlaugung (s. oben).

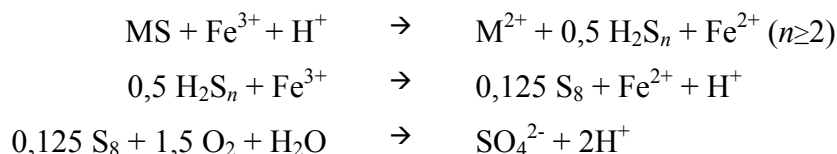
Es werden verschiedene Laugungsmechanismen diskutiert. Bei der indirekten Laugung greifen Eisen(III)- und H⁺-Ionen, welche ständig durch den bakteriellen Metabolismus in der Lösung regeneriert werden, das Metallsulfid an und lösen dies auf (Tributsch, 1999). Die Bakterienzellen haben keinen Kontakt zur Oberfläche des Metallsulfides. Das Auflösen des Metallsulfids ist von seiner Säurelöslichkeit abhängig und geschieht über zwei Mechanismen: Den Thiosulfat- bzw. den Polysulfidweg. Die säureunlöslichen Metallsulfide wie Pyrit (FeS₂), Molybdänit (MoS₂) und Wolframsulfid werden über den Thiosulfat-Stoffwechselweg durch den Angriff von Eisen(III)-Ionen aufgelöst. Die Bindung zwischen Schwefel und Metall bleibt solange erhalten, bis alle sechs Schritte der Einzel-Elektronen-Oxidation vom Mineral durchgeführt sind und Thiosulfat frei wird (Luther 1987, Moses et al 1987, Schippers et al. 1996). Der Thiosulfat wird dann über Polythionat zu Sulfat umgesetzt. Die säurelöslichen Metallsulfide wie Chalkopyrit, Sphalerit und Galena werden von einer Kombination aus Eisen(III)-Ionen und Protonen angegriffen und abgebaut (Rohweder et al.

2003). Ihr Schwefelanteil wird über Polysulfide und anschließend Elementarschwefel zu Sulfat oxidiert.

Der Thiosulfat-Mechanismus wird am Beispiel des säureunlöslichen Metallsulfids Pyrit erläutert:



Der Polysulfatmechanismus – am Beispiel eines säurelöslichen Metallsulfids (MS) – verläuft wie folgt:



Bis vor kurzem wurde der indirekten Laugung die direkte gegenübergestellt. Bei diesem Mechanismus ging man davon aus, dass die an die Mineraloberfläche gehefteten Bakterien das Sulfidmineral direkt über ein Enzymsystem angreifen und auflösen. Silverman und Ehrlich (1964) zeigten, dass angeheftete Zellen viel effektiver Metallsulfide laugen als planktonische, weshalb man den direkten Laugungsmechanismus angenommen hat. Dieser Mechanismus würde aber das Vorhandensein eines Enzymsystems voraussetzen. Ein solches System konnte jedoch nie nachgewiesen werden. Daher wurde diese Hypothese verworfen (Tributsch, 1999).

Gehrke (1998) lieferte eine neue mögliche Erklärung für die bakterielle Laugung. Nach dem vom Autor vorgeschlagenen Modell komplexieren Bakterien aus der Art *A. ferrooxidans* Eisen(III)-Ionen, die das Endprodukt ihres Stoffwechsels darstellen, in ihren extrazellulären, polymeren Substanzen (EPS). Diese Eisen(III)-Ionen greifen das Pyrit nach Art der indirekten Laugung chemisch an. Die bei diesem Angriff entstehenden Eisen(II)-Ionen verbleiben in den EPS und werden der Zelle an der Outer-Membrane wieder zu Eisen(III)-Ionen oxidiert. Die Exopolymerschicht zwischen den angehefteten Bakterien und der Pyritoberfläche fungiert bei der Laugung wie ein Reaktionsraum, in dem der Angriff EPS-komplexierter Eisen(III)-Ionen auf das Pyrit stattfindet (Gehrke, 1998). Daher ist bei diesem Mechanismus, wie bei der direkten Laugung, eine Anheftung der Zellen an die Oberfläche des Metallsulfids notwendig. Tributsch (1999) und Rodríguez (2003) haben dieses Modell als „Kontakt-Laugung“ bezeichnet.

Anheftung und Biofilmbildung

Die Entstehung von Biofilmen basiert auf Anheftung von Mikroorganismen an das Substratum, der Vermehrung zu Mikrokolonien und deren Zusammenwachsen zu differenzierten Biofilmen (Flemming und Wingender, 2001). Die Bakterien werden von stark hydratisierten Biopolymeren (Schleimen) zusammengehalten. In einem Biofilm organisiert, sind die Bakterien in der Lage, dank der EPS-haltigen Biofilmmatrix, welche als Wasserrückhaltesystem fungiert, extreme Lebensräume wie salzhaltige Gewässer oder sehr trockene Standorte zu besiedeln. Auch sind sie gegen Zellgifte wie Schwermetalle und Biozide geschützt. Auf der Oberfläche des Substratums bildet sich durch eine irreversible Adsorption organischer Makromoleküle wie Proteine, Polysaccharide, Huminstoffe usw. innerhalb von Sekunden ein *conditioning film*. Die planktonischen Zellen binden primär unspezifische Wechselwirkungen an die Oberfläche. Anfänglich ist dieser Kontakt zwischen Zelle und Oberfläche noch reversibel; nach einigen Minuten wird die Adhäsion bei manchen Organismen aufgrund der zunehmenden Wechselwirkungen von Bestandteilen der Zelloberfläche mit dem Substratum irreversibel. An diese Primärbesiedler können sekundäre Bakterien anderer Arten anheften (Coadhäsion) und so indirekt über die Primärzellen an der Oberfläche fixiert werden. Nach der Verankerung der Zellen erfolgt die Phase der mikrobiellen Akkumulation, die durch Vermehrung der Bakterien aber, auch durch aus der Wasserphase neu hinzukommende Mikroorganismen gekennzeichnet ist. Charakteristisch für diese Phase ist die weitere Produktion von EPS (Flemming und Wingender, 2001), mit deren Hilfe sie an eine Oberfläche anheften können.

Die Zellen von *A. ferrooxidans* sind in der Lage, sich an die Oberfläche verschiedener Metallsulfide anzuheften (Bennett und Tributsch 1978, Rodriguez-Leiva und Tributsch 1988).

Dabei bevorzugen sie besonders Bereiche, die Unebenheiten vorweisen, wie Risse und Spalten. Sie werden vermutlich von den in den Rissen, durch elektrochemische Oxidationsprozesse freigesetzten Ionen angezogen (Acuña et al, 1986). Auf diese Primäranheftung an die Mineral-Oberfläche folgt die Biofilmbildung. Biofilme chemoorganotropher Organismen können mehrere Zentimeter dick werden, wohingegen chemolithotrophe Organismen wie *A. ferrooxidans* Biofilme bilden, die in der Regel nur aus einer Zelllage bestehen (Sharma et al. 1999, Edwards et al. 2000). Daher gibt es bei diesen Organismen mit großer Wahrscheinlichkeit keine Sekundäranheftung. Weiterhin

unterscheiden sich die Biofilme chomolithotropher Bakterien wie *A. ferrooxidans* von den Biofilmen der Heterorophen darin, dass sie kein *conditioning film* ohne Zellen bilden. Diese *conditioning films* bestehen aus organischen Bestandteilen und würden das Wachstum von *A. ferrooxidans* eventuell hemmen. Untersuchungen zeigen, dass die Anheftung von *A. ferrooxidans* auf hydrophoben Wechselwirkungen beruht. Blake et al. (1995) haben nachgewiesen, dass *A. ferrooxidans* durch die Bindung von Eisen(III)-Ionen eine positive Ladung erhält, während das Pyrit unter physiologischen Bedingungen negativ geladen ist. Nach Untersuchungen von Ohmura und Blake (1997) wird die Anheftung von *A. ferrooxidans* an Metallsulfiden durch Aporusticyanin vermittelt. Aporusticyanin ist das Apoprotein des kupferhaltigen Enzyms, Rusticyanin, das auch mit dem intrazellulären Eisen-abhängigen Elektronentransport (Energistoffwechsel) in Zusammenhang gebracht wird. (Ingledew 1982, Blake und Shute 1994). Auch Sasaki (1997) berichtet von der anheftenden Wirkung von Aporusticyanin bei der Anheftung der Bakterien.

Für die Entstehung und den Zusammenhalt von Biofilmen sind EPS verantwortlich. Die Bildung von EPS ist eine generelle Fähigkeit von Mikroorganismen und wurde für prokaryotische Mikroorganismen (Bakterien und Archea) ebenso wie für Eukaryoten (Algen oder Pilze) nachgewiesen. Hauptbestandteil der EPS-Matrix ist Wasser. Wenn es entfernt wird, entstehen filamentöse oder flächige Strukturen als Trocknungsartefakte (Flemming und Wingender, 2001). EPS bestehen aus einer ganze Reihe von Biopolymeren, darunter hauptsächlich Polysaccharide, Proteine, Lipide, Glycoproteine, Phospholipide, Glycolipide und Nucleinsäuren (Flemming und Wingender, 2001). Typische Bausteine der Polysaccharide sind Pentosen und Hexosen sowie Aminozucker und Uronsäuren, die meist aus kurzen, repetitiven, linearen oder verzweigten Einheiten zusammengesetzt sind. Der Zusammenhalt zwischen der Zelloberfläche und den EPS kann über so genannte hydrophobe, phospholipidhaltige Ankerregionen gewährleistet werden, die mit der Zellwand eine kovalente Bindung eingehen. Zum Teil sind die EPS aber auch mit den Zellen locker assoziiert (Whitfield und Valano. 1993). Gehrke (1998) konnte zeigen, dass die Zusammensetzung der EPS von *A. ferrooxidans* stark vom Substrat(um) abhängt. Feste Substrate stimulieren die EPS-Bildung stärker als gelöste, wie Eisen(II)-Ionen. Auch der pH des Mediums spielt eine wichtige Rolle für die Menge und Zusammensetzung der EPS (Wang und McNeil, 1995, Lee et al. 1997).

Häufig spielen bei der Entstehung der Biofilm-Matrix bi- und trivalente Kationen eine wichtige Rolle. Diese können über saure Carboxylgruppen gebunden werden und verändern

die Nettoladung der Zelloberfläche. Sie können durch Brückenbildung zwischen anionischen Gruppen der EPS die Vernetzung der Polymere fördern und so die Matrix stabilisieren (Flemming und Wingender, 2000). So führt z.B. die Entfernung von Calcium(II)- oder Eisen(III)-Ionen aus Belebtschlamm zu einer Destabilisierung (Bruus et al., 1992). Darauf beruht auch eine Methode der EPS-Isolierung, indem divalente Kationen durch Ionenaustauscher aus der Matrix entfernt und die EPS so solubilisiert werden (Frølund et al., 1995). Außerdem fand Bruss et al. (1992) heraus, dass die Komplexbildung von Calcium(II)-Ionen durch EDTA oder EGTA den Zusammenhalt der Matrix schwächt.

Die Menge an EPS und deren Zusammensetzung ist abhängig von den Umständen der Umgebung. Untersuchungen von Gehrke und Sand (1999) haben folgende Zusammensetzung für die EPS von Stamm R1 von *A. ferrooxidans* ergeben:

Tabelle 1. Chemische Zusammensetzung der Zucker-, Lipid- und freie Fettsäuren-Fraktion der EPS von Eisen-II-Ionen-, Sulfat- oder Pyrit-gewachsenen Zellen *A. ferrooxidans*.

EPS Fraktion	Verbindung	% -Gewichtsanteil an der Gesamt-EPS von Zellen mit dem Substrat:		
		Eisen(II)-Sulfat	Pyrit	Schwefel
Zucker	Rhamnose	13,9	10,8	nd ^a
	Fucose	20,5	17,1	nd ^a
	Xylose	0,9	0,8	nd ^a
	Mannose	0,4	0,7	nd ^a
	Glucose	11,4	15,2	40,4
	Glucuronsäure	4,4	3,3	0,6
	Eisen(III)-Ionen	0,7	0,5	nd ^a
Lipid	C _{12:0} ^b	1,9	2,0	2,7
	C _{14:0} ^b	0,4	0,4	0,6
	C _{16:0} ^b	8,8	9,4	12,9
	C _{17:0} ^b	0,9	1,0	1,3
	C _{18:0} ^b	20,2	21,6	29,5
	C _{19:0} ^b	3,9	4,2	5,7
	C _{20:0} ^b	0,8	0,8	1,1
FFA	C _{16:0} ^b	1,7	1,8	2,4
	C _{18:0} ^b	3,8	4,0	5,6

^a nicht detektiert (< 0,08%).

^b äquivalente Kettenlänge von Fettsäuren

Die EPS besteht hauptsächlich aus Zuckern und Lipiden. Während bei der EPS der auf Schwefel gewachsenen Zellen 40% Glucose gemessen werden konnte, zeigten die EPS der Eisen- bzw. Pyrit-gewachsenen Zellen einen Anteil von 11% bzw. 15% an Glucose. Der Anteil an Lipiden ist bei sowohl Schwefel- als auch bei den Eisen- und Pyrit-gewachsenen Zellen hoch. Der Anteil an komplexierten Eisen(III)-Ionen waren bei allen Ansätzen gleich. Die Eisen(III)-Ionen in der EPS spielen bei der Anheftung der Zellen an Oberflächen eine wichtige Rolle (Gehrke, 1998).

Die Isolierung der EPS stellt einen wichtigen Schritt bei der EPS-Analytik dar. Welche Bestandteile bei der Isolierung von EPS gefunden werden, hängt stark von der Isolierungsmethode ab. Viele verschiedene physikalische und chemische Extraktionsmethoden sind bereits angewendet und beschrieben worden. Dazu gehören vor allem Homogenisierung von Biofilmen, die Trennung von Zellen von ihren EPS durch Zentrifugation und Membranfiltration, die Behandlung der Biofilme mit Natronlauge, die Ab- und Auflösung von EPS durch Entzug von zweiwertigen Kationen mit EDTA oder Ionenaustauscher-Harz und die Beschallung mit Ultraschall (Flemming und Wingender 2000). Auch eine Kombination der bereits genannten Methoden kann positive Ergebnisse herbeiführen. Ein Methodenvergleich zur Extraktion von EPS wurde von Braun und Lester (1980) durchgeführt. Sie fanden heraus, dass die High-Speed-Zentrifugation die effektivste Extraktionsmethode für EPS von Zellen von *Klebsiella aerogenes* darstellt. Die Behandlung der Zellen mit Ultraschall brachte die niedrigste gewonnene EPS-Menge.

Die Zugabe von oberflächenaktiven Substanzen – Detergenzien – in die zu bearbeitende Masse fördert die Ablösung von EPS von Zellen (Camper et al. 1985). Zur Ablösung von Zellen von *E.coli* von Kohlepartikeln haben sie zusätzlich zur physikalischen Methode der Homogenisierung einen Zusatz einer Mischung aus Zwittergent, Tris/HCl-Puffer und EGTA verwendet. Auch andere Untersuchungen verweisen auf Benutzung von Detergenzien. Wakao et al. (1984) verwendeten Tween 20, um dessen ablösende Wirkung von auf Pyrit angehefteten Zellen der Art *A. ferrooxidans* zu untersuchen. Jones und Jannasch (1959) und Scheraga et al. (1979) haben gezeigt, dass durch die Bearbeitung von Sedimenten mit oberflächenaktiven Substanzen mehr Kolonie formende Einheiten – Colonie Forming Units – pro Sedimenteinheit nachgewiesen werden konnten als von nicht behandelten Proben. Yoon und Rosson (1990) verwendeten Tween 80, um eine bessere Ablösung und Zählung von am Sediment angehefteten Zellen im trüben Seewasser zu bewirken. Für die Ablösung der Zellen

von *A. ferrooxidans* von Sulfidmineralen verwendeten Escobar und Godoy (2001) mit Erfolg Triton X-100.

Detergenzien

Detergenzien sind durch ihre amphiphile Struktur charakterisiert und sind wasserlösliche, organische Verbindungen mit oberflächen- bzw. grenzflächen-aktivierenden Wirkungen. Sie bestehen aus einem hydrophilen und einem hydrophoben Teil. Der hydrophobe Teil ist eine Kohlenwasserstoffkette (C₈-C₂₂). Der hydrophile Teil kann unterschiedlicher Natur sein (Neugebauer 1990, Woelk 2002), z.B.:

- Anionischer (z.B. Carboxyl- [COO⁻] oder Sulfatgruppe [-SO₃⁻])
- Zwitterionischer (z.B. Aminoacylglycine)
- Kationischer (quartäre Aminogruppen [NR₃⁺] mit einem oder zwei hydrophoben Gruppen oder Salze langkettiger prim. Amine [NH₃⁺])
- Nichtionischer (die Kohlenwasserstoffgruppen sind durch ungeladene, hydrophile Gruppen miteinander verbunden)

Surfakanten neigen zur Selbstaggregation. Bei niedriger Konzentration in wässrigen Lösungen liegen sie als Monomere (einzelne Detergenz-Moleküle) vor. Oberhalb einer charakteristischen Grenze – die CMC, kritische Mizellbildungskonzentration (*critical micellization concentration*) – bilden sich Mizellen aufgrund der hydrophoben Wechselwirkungen aus Detergenz-Molekülen. Die Mizellbildung ist eine Konsequenz der dualen Natur der Detergenz-Moleküle. In einer Mizelle treten die hydrophoben Enden der Moleküle im Zentrum der Mizelle miteinander in Kontakt, während die hydrophilen Enden in die Flüssigkeit ragen. Die Anzahl der Monomere, welche die Mizelle bilden, wird Aggregationszahl genannt. In den biologischen Arbeitsmethoden werden Detergenzien häufig für die Proteinisolierung und Elektrophorese etc. benutzt. Einige Arbeiten haben sich auch mit der zellablösenden Wirkung der Detergenzien von Oberflächen, unter anderem von Sulfidmineralen befasst. In dieser Arbeit werden 4 Detergenzien verwendet. Im Folgenden werden die vier, in dieser Arbeit verwendeten Detergenzien vorgestellt.

Zwittergent:

Camper et al. (1985) verwendeten Zwittergent für die Ablösung von Zellen von *A. ferrooxidans* von Pyrit. In Anlehnung an die Ergebnisse von Camper et al. (1985) benutzte auch Gehrke (1998) Zwittergent zum Zwecke der Ablösung von Zellen von *A. ferrooxidans*,

von Sulfidmineralen. Es ist ein zwitterionisches Detergenz, das elektrisch neutrale ist, da sich die Ladungen im Molekül gegenseitig aufheben. Es können jedoch in manchen Fällen starke Polarisierungen existieren, so dass das Molekül eine Ladung erhält. In Abbildung 1 ist die Strukturformel von Zwittergenz dargestellt.

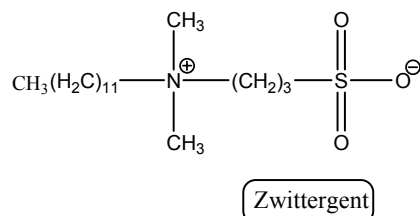


Abbildung 1: Strukturformel von Zwittergenz

Triton X-100:

Dieses Detergenz wurde von Escobar und Godoy (2002) verwendet. Sie haben Triton X-100 zum Ablösen an Pyrit angehefteter Zellen von *A. ferrooxidans* Stamm ATCC 19859 verwendet. Dieses Tensid wird häufig für die Solubilisierung von Enzymen wie Proteinkinasen oder Adenosintriphosphaten verwendet. Auch für die Untersuchung von Membranproteinen wie Bestandteile von Photosystemen, Ionenkanälen und -Rezeptoren wurde Triton X-100 benutzt. Es ist ein nichtionisches Tensid. Die Abbildung 2 zeigt die Strukturformel von Triton X-100.

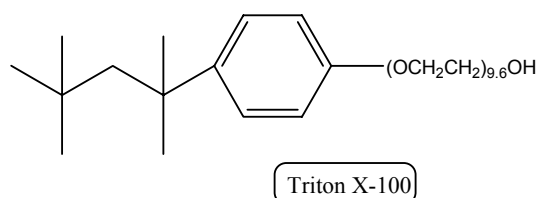


Abbildung 2: Strukturformel von Triton X-100

Tween 20:

Tween 20 wurde von Rodriguez et al. (2002) benutzt, um Zellen von *A. ferrooxidans* und *L. ferrooxidans* von Sulfidmineralen abzulösen. Auch Wakao et al. (1984) haben Tween 20 für die Ablösung von Zellen von *A. ferrooxidans* vom Pyrit verwendet. Dieses nichtionische Tensid wird als Solubilisierungsmittel für die Membranchemie z.B. Isolieren von Membranproteinen und als Additiv für Nährmedien genutzt werden. Sehr bedeutsam ist dieses Tensid für immunologische Nachweisverfahren. Es unterdrückt wirkungsvoll die

unspezifische Reaktion zwischen Antikörpern, Antigenen und Fremdmolekülen. Abbildung 3 zeigt die Strukturformel von Tween 20.

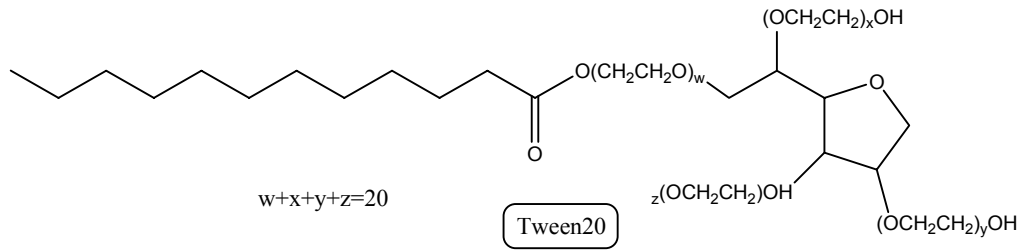


Abbildung 3: Strukturformel von Tween 20

Tween 80:

Yoon und Rosson (1989) behandelten Sedimente aus Seewasser mit einer Tween 80-Lösung, um die Anzahl der am Sediment angehefteten Zellen durch Ablösung bestimmen zu können. Rojas-Chapana (1999) benutzte Tween 80, um die Wirkung des Detergenzes auf die mikrobielle Pyritoxidation durch Zellen von anderen, als die in dieser Arbeit verwendeten Stämmen von *A. ferrooxidans* zu untersuchen. Nasernejad et al. (2000) stellten fest, dass Tween 80 in niedrigen Konzentrationen (1500 ppm) die Laugung durch *A. ferrooxidans* beeinflusst. Besonders wirkungsvoll kann der dieses Detergenz für die biotechnologische Gewinnung mikrobieller Enzyme eingesetzt werden. Tween 80 steigert die Bildung von mikrobiellen Enzymen wie Cellulase in signifikanter Weise. In Abbildung 4 ist die Strukturformel von Tween 80 dargestellt.

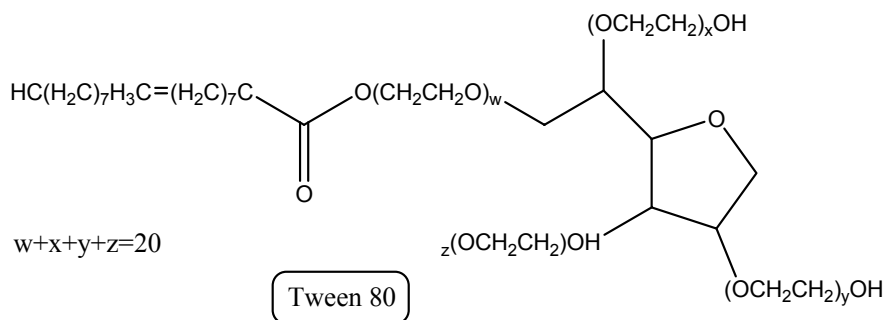


Abbildung 4: Strukturformel von Tween 80

Ziel der Arbeit

Im Rahmen dieser Diplomarbeit soll überprüft werden, welches der oben aufgeführten Detergenzien in der Lage ist, die meisten der auf dem Sulfidmineral Pyrit angehefteten

Zellen von *A. ferrooxidans* abzulösen, ohne sie dabei zu beschädigen. Dabei sollte dann auch die größtmögliche Menge an EPS in Abhängigkeit vom Detergenz bestimmt werden. Die EPS-Menge, die von sessilen Zellen gewonnen werden kann, fällt in der Regel gering aus. Trotz der erhöhten EPS-Menge sessiler Zellen ist die Ausbeute an EPS bei diesen Zellen niedrig, da das Ablösen dieser Zellen bzw. ihrer EPS vom Substratum den kritischen Schritt darstellt. Die Möglichkeit eines AblöSENS spielt daher für eine EPS-Gewinnung eine entscheidende Rolle. Daher werden bereits vorhandene Methoden der Zellablösung und EPS-Gewinnung miteinander verglichen, um sie gegebenenfalls verbessern und optimieren zu können. Durch die Optimierung können genügend EPS gewonnen werden, um eine EPS-Analytik durchführen zu können und die unterschiedlichen Zusammensetzungen nach Produktion auf verschiedenen Sulfidmineralien und bei unterschiedlichen Wachstumsbedingungen klären zu können.

3 Material und Methoden

3.1 Bakterien

Alle Versuche zum Vergleich und Optimieren von Verfahren zur EPS-Gewinnung wurden mit Bakterien der Art *A. ferrooxidans* durchgeführt. Es wurden die Stämme R1 und A2 verwendet. Sie stammen aus Erzproben des Bergwerkes Ilba (Baia Mare, Rumänien) und werden in der Stammsammlung der mikrobiologischen Abteilung im Biozentrum Klein Flottbek der Universität Hamburg kultiviert.

Die Untersuchungen wurden hauptsächlich an den Zellen des Bakterienstammes R1 durchgeführt. Dieser Stamm ist gut beschrieben (Sand et al. 1992, Hallmann et al. 1993, Gehrke et al. 1998) und wurde daher in allen Teilen dieser Arbeit verwendet. Um die Arbeitsergebnisse auf Stammspezifität zu überprüfen, wurden bei der Gewinnung sessiler Zellen zusätzlich die Zellen des Stammes A2 aus der gleichen Verwandtschaftsgruppe wie R1 verwendet.

3.2 Nährmedien

Zur Anzucht von *A. ferrooxidans* wurde autotrophes Nährmedium nach Mackintosh (1978) benutzt:

Lösung 1

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	132,2 mg
$\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$	25,4 mg
$\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$	147,0 mg
KH_2PO_4	27,2 mg
$\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$	100,0 μg
ZnCl_2	70,0 μg
$\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$	120,0 μg
H_3BO_3	31,0 μg
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$	12,1 μg
$\text{CuCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$	85,2 μg
H_2SO_4	0,53 mL
Aqua deion.	ad 900 mL

Lösung 2

FeSO ₄ * 7H ₂ O	100 g
Aqua deion.	ad 1000 mL

Wasch- bzw. Mineralsalzlösung

Lösung 1	900 mL
Aqua deion.	100 mL

Nährlösung

Lösung 1	900 mL
Lösung2	100 mL

Alle hergestellten Lösungen wurden – soweit nicht anders beschrieben – bei 112° C und 0,5 bar Überdruck für 30 Minuten autoklaviert. Bei Volumina ≥ 5 Liter wurde die Sterilisationszeit auf 60 Minuten erhöht. Die Sterilisation der Lösungen mit einem Volumen von über 10 Litern erfolgte über einen Zeitraum von 90 Minuten.

Um die Autoxidation der Eisen(II)-Sulfat-Lösung während der Hitzesterilisation zu verhindern, wurde der pH der Lösung 2 mit konzentrierter Schwefelsäure auf 1,2 eingestellt. Nach dem Abkühlen wurde die Eisen(II)-Sulfat-Lösung in einem Verhältnis von 1:10 (v/v) der Mineralsalzlösung beigemischt. Die fertige Nährlösung wies einen pH von 2 auf. Als Waschlösung bei der Zell- und EPS-Ernte wurde Mineralsalzlösung verwendet.

3.3 Substratum

Die Anzuchten zur Gewinnung sessiler Zellen sowie zur EPS-Gewinnung von Zellen der Art *A. ferrooxidans* wurden mit Pyrit als Substratum durchgeführt. Das Pyrit wurde auf eine Partikelgröße von 50-100 μm gesiebt und durch halbstündiges Kochen in 6 N Salzsäure von Eisen(III)-Ionen befreit. Anschließend wurde das Pyrit mit Aqua deion. gewaschen. Durch anschließendes Waschen in Aceton wurde das Pyrit von Schwefelverbindungen befreit. Das restliche Wasser wurde verdrängt, um den Trocknungsprozess zu beschleunigen. Das so behandelte Pyrit wurde anschließend für 24 h luftgetrocknet und in einem Teilvakuum bei

115°C für 48 h trocken sterilisiert. Die Lagerung erfolgte unter Teilvakuum, um eine chemische Oxidation durch Luftsauerstoff zu verhindern.

Die chemische Zusammensetzung des Pyrits ist in der Tabelle 2 angegeben.

Tabelle 2: Chemische Zusammensetzung des verwendeten Pyrits (Analyse nach Grützner, 2001)

Element	Fe	Cu	Ni	Co	Pb	Zn	Si	
Anteil (%)	46,64	0,0373	0,0260	0,0514	0,0557	0,0274	0,81	
Element	Ca	Mg	Al	K	Cr	Mn	Ti	S (total)
Anteil (%)	0,4	0,26	0,19	0,19	0,0409	0,017	0,0161	49,57

Eisen und Schwefel stellen erwartungsgemäß die Hauptelemente des Pyrits dar. Das aus den Gewichtsanteilen berechnete Molverhältnis zwischen Schwefel und Eisen von 2,09:1 entspricht dem theoretischen Verhältnis.

3.4 Detergenzien

Für die EPS-Gewinnung sowie für die Versuche zur Ablösung sessiler Zellen von Pyrit wurden vier verschiedene Detergenzien benutzt: Zwittergent, Triton X-100, Tween 20 und Tween 80.

Bei Zwittergent handelt es sich um ein zwitterionisches Detergenz.

Triton X-100 ist ein nichtionisches Tensid, das häufig für die Isolierung, Reinigung und Analytik von Membranbestandteilen verwendet wird. Es besitzt ein großes Solubilisationsvermögen und verbindet dies mit maximalem Erhalt der biologischen Eigenschaften.

Tween 20 ist ebenfalls nichtionisch und wird in immunologischen Nachweisverfahren verwendet. Es ist in der Lage, wirkungsvoll unspezifische Reaktionen zwischen Antikörpern, Antigenen und Fremdmolekülen unterdrücken.

Das nichtionische Detergenz Tween 80 wird oft als Additiv für Zellkultur-Medien verwendet. Die Detergenzien wurden in folgenden Konzentrationen angesetzt:

Zwittergent	0,001% in einer Lösung aus 10mM Tris-HCl-Puffer (pH 7) und 1mM EGTA. (Camper et al., 1985)
-------------	--

Tween 20	0,1 % (v/v), in einer Lösung aus 10 mM Tris-HCl-Puffer (pH 7). (Rodríguez et al., 2001)
Tween 80	0,001% (w/v), in einer Lösung aus 10 mM Tris-HCl-Puffer (pH 7). (Bae Yoon et al., 1990)
Triton X-100	0,05% (w/v), in einer Lösung aus 10 mM Tris-HCl-Puffer (pH 7). (Escobar und Godoy, 2002)

Um zu überprüfen, ob die Konzentration der Detergenzien eine Steigerung der EPS-Gewinnung und der Ablösung sessiler Zellen bewirkt, wurden für einige Versuche die Konzentrationen der Detergenzien auf 1,5% erhöht.

Außerdem wurde den Detergenzien-Lösungen Eisen(II)-Ionen zugesetzt. Blake et al. (2000) zeigten, dass durch die Zugabe von Eisen(II)-Ionen zu der Nährlösung die Zellen nicht auf Pyrit haften. Die Endkonzentration der Eisen(II)-ionen in der Detergenzienlösung betrug 100mM. Die Lösungen wurden sterilfiltriert und sowohl bei der Ablösung sessiler Zellen als auch bei den Versuchen zur EPS-Gewinnung verwendet.

Weiterhin wurde den Detergenzien Dithioerythrit (DTT) zur Erhöhung der Effektivität hinzugefügt. Die Endkonzentration in den Detergenzienlösungen betrug 0,07%. Dieses Agens soll die Sulfidbrücken, die zwischen den EPS der Bakterienzellen und dem Mineral entstehen, reduzieren und so die Zellen ablösen. (Huber pers. comm.).

Zusammenfassend werden alle verwendeten Lösungen in der Tabelle 3 aufgeführt.

Tabelle 3: Konzentrationen von Detergenzien mit und ohne weiteren Zusätzen (Fe²⁺ = Eisen(II)-Ionen)

Zwittergent	Tween 20	Tween 80	Triton X-100	Dithioerythrit
0,001%	0,1 % (v/v)	0,001% (w/v),	0,01% (w/v)	0,07%
0,001% + 0,03% Fe ²⁺	0,1% (v/v) + 0,03% Fe ²⁺	0,001% (w/v) + 0,03% Fe ²⁺	0,01% (w/v) + 0,03% Fe ²⁺	
1,5 %	1,5 %	1,5 %	1,5 %	
1,5 % + 0,03% Fe ²⁺	1,5 % + 0,03% Fe ²⁺	1,5 % + 0,03% Fe ²⁺	1,5 % + 0,03% Fe ²⁺	

3.5 Kulturführung

3.5.1 Stammkulturen

Die Stammkulturen wurden in einem 100 mL Erlenmeyerkolben mit 50 mL Nährlösung bei 28 °C im Dunkeln auf einem Rundschüttler (Infros TR, 120 Upm) angezogen. Sie wurden mit 10% Inoculum (v/v) des jeweiligen Stammes aus der Sammlung beimpft. Die Kultur galt als

bewachsen, wenn die ursprüngliche, leicht grünliche Farbe in eine Braunfärbung überging. Die Färbung entsteht durch die Oxidation des Substrats (Eisen(II)-Ionen). Die Kulturen wurden anschließend für 3 bis 4 Wochen bei 17°C im Dunkeln gelagert (Friedrich 1991). Nach Ablauf dieser Ruhephase wurden sie auf frisches Nährmedium überimpft.

3.5.2 Zwischenkulturen

Die Zwischenkulturen wurden in 1 L Erlenmeyerkolben mit 500 mL Nährlösung und 10% Inokulum (v/v) bei 28°C im Dunkeln auf einem Rundschtüttler (Infros TR, 120 Upm) angezogen. Die Inkubationszeiten entsprachen denen der Stammkulturen. Gewachsene Zwischenkulturen wurden sofort als Inokulum für die Untersuchungen verwendet.

3.5.3 Massenzuchten

Für die Massenzuchten wurden 5 L, 10 L bzw. 20 L Steilbrustflaschen mit 4,5 L, 9 L bzw. 18 L Nährlösung verwandt. Die Inkubation erfolgte bei 28°C im Dunkeln und aktiver Belüftung mit steriler Pressluft. Es wurde mit 5% (v/v) Inokulum beimpft.

Die Gesamtvolumina der Massenzuchten betragen bei den Versuchen zur Ablösung sessiler Zellen von Pyrit 20 L bzw. 60 L bei den Versuchen zur EPS-Gewinnung. Die Zellen wurden geerntet, sobald die ursprüngliche, grünliche Farbe sich in eine bräunliche verwandelt hatte (Eisen(III)-hydroxid). Zu diesem Zeitpunkt befanden sich die Zellen in der späten logarithmischen Wachstumsphase (Klock, 2003).

Das Flüssigkeitsvolumen wurde zunächst über ein als Cross-Flow-Filter geschaltetes Hohlfasermodule (Ultrafilter, Fresenius, cut off 3500 Da) nach dem Prinzip der Druckfiltration mit einer Schlauchpumpe (Masterflex) auf maximal 900 mL (Gerke 1998) eingengt. Der Filter wurde zuvor bei 112°C und 0,5 bar Überdruck für 30 min. sterilisiert. Die Zellernte erfolgte durch Zentrifugation bei 10.000 x g für 20 min. Das Pellet wurde in 20 mL Mineralsalzlösung resuspendiert und die Zellzahl bestimmt.

3.5.4 Anzucht auf Pyrit

Die Anzuchtkulturen dienen zur Ablösung sessiler Zellen bzw. zur EPS-Gewinnung. Die Ablösung sessiler Zellen erfolgte durch Anzucht in 100 mL Erlenmeyerkolben mit 50 mL

Mineralsalzlösung und 10% Pyrit (w/v). Den Ansätzen wurde 0,2 g/L Eisen(III)-Chlorid hinzugefügt. Die Zellzahl wurde mit Zellen aus der Massenzucht auf 1×10^{10} Zellen/mL eingestellt. Die Kultivierung erfolgte über einen Zeitraum von einer Woche im Dunkeln bei 28 °C auf einem Rundschtüttler (Infros TR) bei 120 Upm. Durch Titration mit 5 M KOH wurde der pH über die gesamte Versuchsdauer zwischen 1,9 und 2,0 konstant gehalten.

Die Anzuchten für die Versuche zur EPS-Gewinnung erfolgten in 1L Erlenmeyerkolben mit 500 mL Mineralsalzlösung und 10% Pyrit (w/v). Den Ansätzen wurde 2g/L Eisen(III)-Chlorid hinzugefügt. Als Inokulum dienten die Zellen aus der Massenzucht. Die Zellzahl des Inokulums betrug 1×10^{10} Zellen/mL. Die Kultivierung erfolgte über einen Zeitraum von einer Woche im Dunkeln bei 28 °C auf einem Rundschtüttler (Infros TR) bei 120 Upm. Der pH wurde über die gesamte Versuchsdauer durch Titration mit 5 M KOH zwischen 1,9 und 2,0 konstant gehalten. Der zeitliche Verlauf der Substratoxidation während der Inkubationszeit wurde in beiden Fällen durch regelmäßige Messung der Konzentration von Eisen(II)-Ionen in der Nährlösung verfolgt.

3.5.5 Reinheitskontrollen

Eine Kontrolle der Kulturen auf Kontamination erfolgte bei 1000facher Vergrößerung im Lichtmikroskop. Die morphologische Einheitlichkeit der Bakterienzellen im Blickfeld galt als Kriterium für die Reinheit der Kulturen. Außerdem wurden Aliquots der Kulturen durch Ausstreichen auf Harrison- und DEV-Agar speziell auf acidophile bzw. neutrophile, chemoorganotrophe Verunreiniger überprüft. Die Inkubation erfolgte bei 28°C für einen Zeitraum von 14 Tagen im Dunkeln.

3.6 Quantifizierung der Bakterianheftung

Um die Bakterianheftung an Pyrit als Substratum zu quantifizieren, wurden die Zellen des Stammes R1, wie bereits im Kapitel. Anzuchtskulturen zur Gewinnung sessiler Zellen beschrieben, inkubiert. Die Zellen wurden nach der Ernte in Mineralsalzlösung resuspendiert und nach Zugabe von 0,2 g/L Eisen-(III)-Ionen über Nacht bei 17°C im Dunkeln gelagert. Die Zellzahl wurde mit Zellen aus der Massenzucht auf 1×10^{10} Zellen/mL eingestellt. Der zeitliche Verlauf der Anheftung auf Pyrit wurde über 7 Tage verfolgt. Die quantitative Abschätzung angehefteter Zellen basierte auf der Messung der Abnahme der planktonischen

Zellzahl im Kulturüberstand und erfolgte lichtmikroskopisch mit Hilfe einer Thoma-Zählkammer bei 320facher Vergrößerung (Das et al. 1998, Dziurla et al. 1998).

3.7 Ablösung sessiler Zellen von Pyrit

Um festzustellen, welches Detergenz die höchste Effizienz bei der Ablösung der Zellen vom Pyrit hat und um einen ersten Einblick in die Wirkung der Detergenzien zu bekommen, wurden Versuche sowohl mit den Zellen des Stammes R1 als auch mit Zellen von Stamm A2 nach Anzucht auf Mineral durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden die bereits in der Tabelle 3.2 aufgeführten Lösungen verwendet.

Vor Einsatz bzw. Zusatz der Detergenzien wurde eine Probe des Überstandes genommen, um die Anzahl der planktonischen Zellen zu bestimmen. Danach wurden die planktonischen Bakterien durch bakteriendurchlässiges Filterpapier (Schleicher & Schuell) vom bewachsenen Pyrit getrennt. Das Pyrit mit den sessilen Bakterien verblieb im Filtrückstand. Dieser wurde dann bei den Ansätzen zur Zellablösung in 15 mL und bei den Ansätzen zur EPS-Gewinnung in 150 mL verschiedener Detergenz-Lösungen (Zusammensetzung siehe 3.5) aufgeschlämmt. Die angehefteten Zellen wurden in Anlehnung an eine Verfahrensweise von Camper et al. (1985) durch Homogenisieren des Filtrückstandes (Ultra -Turrax T 25, IKA, 3 bzw. 10 min bei 12000 bis 135000 Upm und 4 °C) vom Feststoffschlamm getrennt. Dann wurde der Überstand mit den abgelösten Zellen durch 5 minütiges Zentrifugieren bei 800 UPM vom verbleibenden Feststoff getrennt und die Zellzahl bestimmt. Dies ergab die Zahl der vom Pyrit abgelösten, sessilen Zellen.

Anschließend wurden dann die EPS von den Zellen durch Zentrifugation getrennt (S. 3.7, EPS-Gewinnung). Von diesem Überstand (EPS-Rohextrakt) wurden Proben zur Kohlenhydratanalytik und zur KDO-Bestimmung als Nachweis für nicht erfolgte Zelllyse genommen und bis zur Messung eingefroren. Die Einwirkzeit der Detergenzien variierte zwischen 15 und 60 min.

3.8 Extrazelluläre, polymere Substanzen –EPS–

3.8.1 Isolierung

Die EPS-Isolierung erfolgte mechanisch durch Zentrifugieren. Dabei wurden die EPS im Gravitationsfeld einer schnell rotierenden Zentrifuge von der Oberfläche der Bakterien abgerissen. Diese Methode wurde von Brown und Lester (1980) entwickelt. Eine Kombination aus chemischen und physikalischen Extraktionsmethoden soll die Reproduzierbarkeit und Effektivität der Methoden erhöhen (Nielsen und Jahn, 1999). Daher wird auch in dieser Arbeit in Anlehnung an die EPS-Extraktion von Gehrke (1998) das Homogenisat zum Abtrennen der EPS von den Zellen zentrifugiert.

Es wurden nur EPS von angehefteten Zellen isoliert. Die Gewinnung dieser Zellen wurde bereits im vorherigen Kapitel behandelt. Anschließend wurde das Homogenisat, bestehend aus dem Detergenz und vom Pyrit gelösten Bakterien, für 20 min bei 10000x g und 10 °C zentrifugiert (Gehrke, 1998). Die Exopolymere verblieben dabei aufgrund ihrer geringen Dichte im Kulturüberstand.

Auch hier wurden Proben zur Kohlenhydratanalytik und KDO-Bestimmung eingefroren.

3.8.2 Reinigung

Die EPS-haltigen Zentrifugationsüberstände wurden bei 4°C mehrere Tage lang sukzessive gegen schwefelsaures Wasser (pH 2 und 4) – zum Entfernen der Eisen- und Schwefelsäurereste –, dann gegen Aqua deion. (pH 6) und Milliporwasser (pH 7) in sterilen Dialyseschläuchen (Spectra/Por[®], MW cut off 3500 Da, Serva, gelagert in 0,2% Natriumazid) partiell gereinigt (Rohextrakt). Die Erhöhung des pH-Wertes während der Dialyse führte zum Ausfallen der EPS (Gehrke, 1998). Bei den pH-Werten 4 und 6 wurde der Dialyseflüssigkeit 0,2 % Natriumazid (w/w) zugesetzt, um einen Aufwuchs von heterotrophen Bakterien zu verhindern.

3.8.3 Nachweis

Der EPS-Nachweis im EPS-Rohextrakt erfolgte sowohl bei den Ansätzen zur Ablösung sessiler Zellen als auch bei denen zur EPS-Gewinnung mittels Bestimmung der

Kohlenhydratmenge nach Dubois et al. (1956). So wird festgestellt, ob bei den bereits beschriebenen Behandlungsmethoden EPS gewonnen werden konnten.

Darüber hinaus wurde bei den Ansätzen zur EPS-Gewinnung das auf -20 °C gefrorene Dialysat bei reduziertem Druck (0,1 mbar) in einer Gefriertrocknungsanlage (Freezemobil 12, VIRTIS) ins Trockene überführt. Das Gewicht der getrockneten EPS wurde gravimetrisch mit einer Analysenwaage bestimmt. Die Lagerung der Dialysate erfolgte bei -20 °C .

3.9 Analytische Nachweisverfahren

3.9.1 Zellzahlen

Die Bestimmung der Gesamtzellzahl erfolgte mit Hilfe einer Thoma-Zählkammer (Tiefe:0,02 mm; Fl. Kleinquadrat: $0,0025\text{ mm}^2$) bei einer Vergrößerung von $320\times$ unter einem Lichtmikroskop. Die notwendigen Verdünnungen wurden mit steriler Waschlösung durchgeführt.

3.9.2 pH

Der pH-Wert wurde mit einem Digital-pH-Meter (WTW, Modell pH 522) mit Ingold-Elektrode) gemessen.

3.9.3 Eisen(II)- und (III)-Ionen

Die Bestimmung der Eisen(II)- und -(III)-Ionen erfolgte nach dem Deutschen Einheitsverfahren zur Wasseruntersuchung (DEV 1984) mit Hilfe des Phenanthrolin-Tests. Eisen(II)-Ionen bilden mit 1,10-Phenanthrolin einen roten Farbkomplex, der spektrophotometrisch quantifizierbar ist (Metrohm 622 Photometer, 492 nm). Die Konzentration von Eisen(III)-Ionen wurde aus dem Gesamteisenionen-Gehalt errechnet, der zuvor an Parallelproben nach Reduktion der Eisen(III)-Ionen zu Eisen(II)-Ionen mit Hydroxylamin zu ermitteln war. Als Eichstandard diente Eisen(II)-Sulfat-Heptahydrat (Eichbereich $0\text{-}4\text{ mg Eisen(II)-Ionen/L}$).

3.9.4 2-Keto-3-Desoxyoctonat –KDO–

2-Keto-3-Desoxyoctonat (KDO) kommt in der Zellwand der Gram negativen Bakterien vor. Das Vorhandensein von KDO im zellfreien Überstand ist ein Indikator für (unerwünschte) Zellwandreste in den EPS und damit für eine in der EPS-Präparation erfolgte Zellyse. Die Bestimmung von KDO im zellfreien EPS-Extrakt erfolgte nach Karkhanis et al. (1978). KDO wird 2-Keto-3-Desoxyoctonat durch Schwefelsäurehydrolyse aus den Polymeren freigesetzt, in Gegenwart von Periodat und Arsenit mit Thiobarbitursäure in einen roten Farbkomplex überführt und am Photometer (Novaspec, LKB) bei 548 nm vermessen. Als Eichstandard diente die reine Substanz (Sigma, Eichbereich 0-20 mg/L).

3.9.5 Kohlenhydrate

Die Bestimmung der Kohlenhydratmenge erfolgte nach Dubois et al. (1956). Sie dient dazu, festzustellen, ob bei den bereits beschriebenen Behandlungsmethoden EPS gewonnen werden konnten. Dabei bilden die einfachen Zucker, Oligo- und Polysaccharide und deren Derivate einen gelben bis orangen Farbkomplex, wenn sie mit einer 10% -igen Phenollösung und konzentrierter Schwefelsäure behandelt werden. Die Extinktion kann dann am Photometer (Novaspec, LKB) bei 485 nm vermessen werden.

Eisen(II)

4. Ergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, welches der vier Detergenzien Zwittergent, Tween 20, Tween 80 und TritonX-100 bzw. ob ein Agens wie Dithioerythrit (DTT) am besten Zellen bzw. EPS von Pyritoberflächen ablöst (solubilisiert) oder ob die Zugabe von Eisen(II)-Ionen zu den Detergenzien eine verstärkende Wirkung auf die Ablösung hat. Die Arbeiten wurden mit den Versuchen zur Messung der Pyritoxidationsaktivität der Zellen von *A. ferrooxidans* R1 und A2 begonnen. Außerdem wurden Versuche zur Anheftung der Zellen des Stammes R1 an Pyrit durchgeführt.

Daran schlossen sich Versuche zur Ablösung sessiler Zellen der Stämme R1 und A2 von *A. ferrooxidans* von Pyrit an, um für diese Fragestellung die Effizienz der vier ausgewählten Detergenzien zu bestimmen. Auf diesen Ergebnissen aufbauend wurden Versuche zur EPS-Gewinnung von Zellen des Stammes R1, die auf Pyrit angeheftet und abgelöst waren, durchgeführt. Es wurde davon ausgegangen, dass je mehr Zellen ein Detergenz vom Pyrit ablöst, desto mehr EPS kann in der Folge gewonnen werden. Um auch stammspezifische Einflüsse zu prüfen, wurden ausgewählte Versuche zur Zellablösung mit dem *A. ferrooxidans* Stamm A2 wiederholt.

4.1 Oxidationsrate von Pyrit

Die Oxidationsrate Pyrit wurde sowohl für die Zellen des *A. ferrooxidans* Stammes R1 als auch für die des Stammes A2 gemessen. Anhand dieses Versuches konnte festgestellt werden, in welcher Wachstumsphase sich die Zellen befinden. So war es möglich Zellen immer in der logarithmischen Wachstumsphase zu ernten.

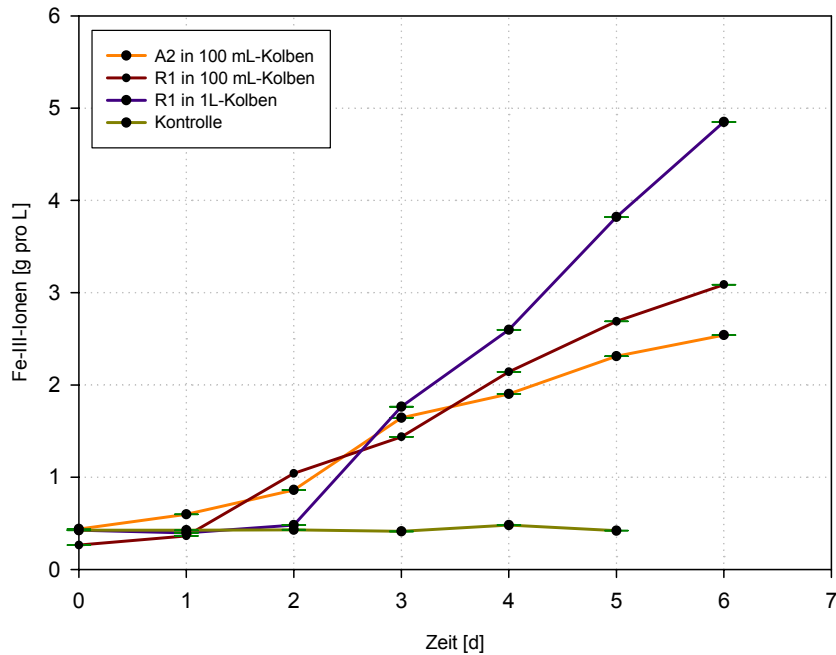


Abbildung 5: Pyritoxidation durch Zellen der der Stämme R1 und A2 von *A. ferrooxidans*. Die Oxidation wurde anhand der Zunahme der Konzentration an Eisen(III)-Ionen in der Kulturlösung verfolgt. Das Inokulum betrug 10^{10} Zellen / mL die sich in der log-Phase befanden. Im Falle des Stammes R1 in 100 mL-Kolben sind Mittelwerte von 14, bei den Zellen von Stamm A2 in 100mL-Kolben von 6 und bei den Ansätzen zur EPS-Gewinnung in 1L-Kolben ebenfalls Mittelwerte von 6 Versuchansätzen gezeigt. Die Standardabweichungen sind klein und daher nur als schmale Linien entlang der Punkte sichtbar. Die Daten beruhen auf Mittelwerten zweier paralleler Ansätze. Die Versuche wurden bei einer Temperatur von 28°C durchgeführt, die Kulturen wurden auf einem Rundschüttler bei 120 UPM geschüttelt.

Die lag-Phase dauerte bei den Zellen des Stammes R1 in den großen Ansätzen ungefähr 2 Tage. Danach stieg die Rate der Substratoxidation steil an. Ein ähnlicher Anstieg war bei den Zellen des gleichen Stammes in den kleinen Ansätzen nicht zu beobachten. Die Pyritoxidation fing hier nach einer eintägigen lag-Phase an.

Bei den Zellen des Stammes R1 betrug die Pyritoxidationsrate in 100mL-Kolben 0,41 mg/d bzw. 8×10^{-7} ng pro Zelle und in den großen 1L-Kolben zur EPS-Gewinnung 0,64 mg/d bzw. 1×10^{-7} ng pro Zelle. Die Pyritoxidation durch die Zellen des Stammes A2 fing gleich nach der Zugabe der Bakterien ohne messbare lag-Phase an. Dieser Stamm oxidierte Pyrit mit einer Rate von 0,36 mg/d bzw. 7×10^{-7} ng pro Zelle.

4.2 Anheftung an Pyrit

Durch Versuche zur Anheftung sollte geprüft werden, ob die planktonischen Zellen während der Inkubationszeit von einer Woche in den sessilen Zustand übergehen und an das Pyrit

anheften. Die Versuche zur Anheftung an Pyrit wurden exemplarisch an Zellen der Art *A. ferrooxidans* Stamm R1 durchgeführt. Die Anheftung wurde direkt durch die Bestimmung der Zellzahl im Überstand verfolgt. Für die Anzahl von 5×10^{11} Zellen, das als Inokulum in diesem Versuch verwendet wurde, wären mind. 6,25g Pyrit notwendig, damit die gesamten Zellen an das Pyrit anheften könnten. Da die Zellen im Überschuss zum Pyrit (Pyritmenge = 5g) gegeben wurden, konnte untersucht werden, wie viele Zellen sich an eine gegebene Menge Pyrit anheften können.

Ergebnisse

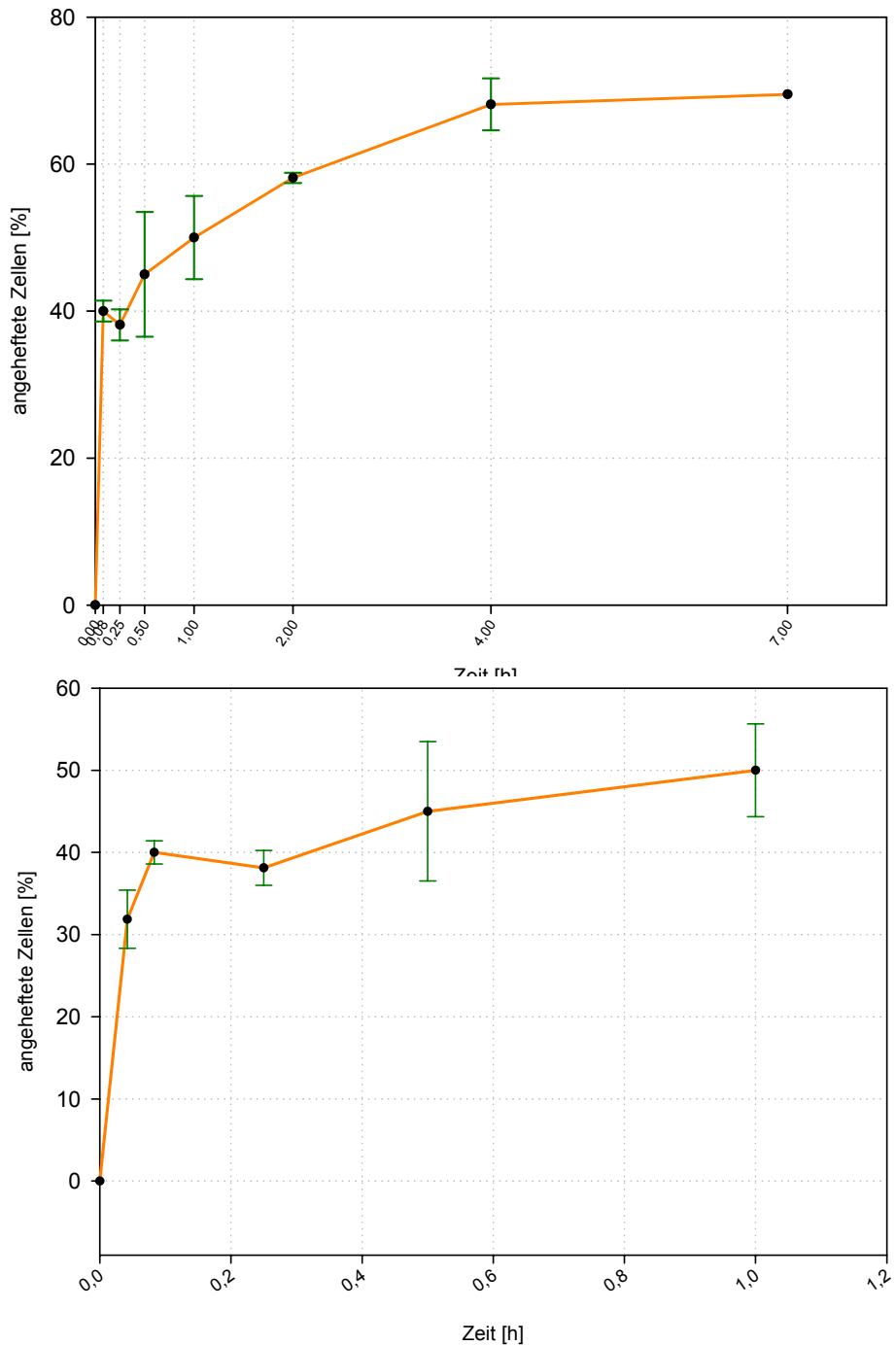


Abbildung 6: Anheftung von Zellen von *A. ferrooxidans* Stamm R1 an Pyrit. Der zeitliche Verlauf der Anheftung wurde über 7 h indirekt aus der Differenz zwischen der Zellzahl des Inokulums und der Zahl der planktonischen Zellen im Überstand ermittelt. Die Anheftung über einen Zeitraum von 7 h wird in Abb. A dargestellt. Die Ausschnittsvergrößerung in 1B zeigt die Werte für die erste Stunde in erhöhter Auflösung. Die Versuche wurden in Mineralsalzlösung mit 10% Substratum (w/v) durchgeführt. Das Inokulum betrug 1×10^{10} Zellen/mL die sich in der log-Phase befanden. Die Daten beruhen auf Mittelwerten zweier paralleler Ansätze. Die Versuche wurden bei einer Temperatur von 28°C durchgeführt, die Kulturen wurden auf einem Rundschüttler bei 120 UPM geschüttelt. I = Standardabweichung

In Abbildung 1 ist zu sehen, dass sich die Zellen des Stammes R1 bereits in der ersten Stunde zu 50% anheften. Die maximale Anheftung der Zellen pro min beginnt sofort nach Zugabe der Zellen zum Pyrit und endet nach 2,5 min. In dieser Zeit heften sich 3×10^{10} Zellen pro g Pyrit an. Danach verlangsamt sich die Anheftung. Die maximale Zelldichte auf dem Mineral wurde nach 6 h von 72% der zugegebenen Zellen erreicht.

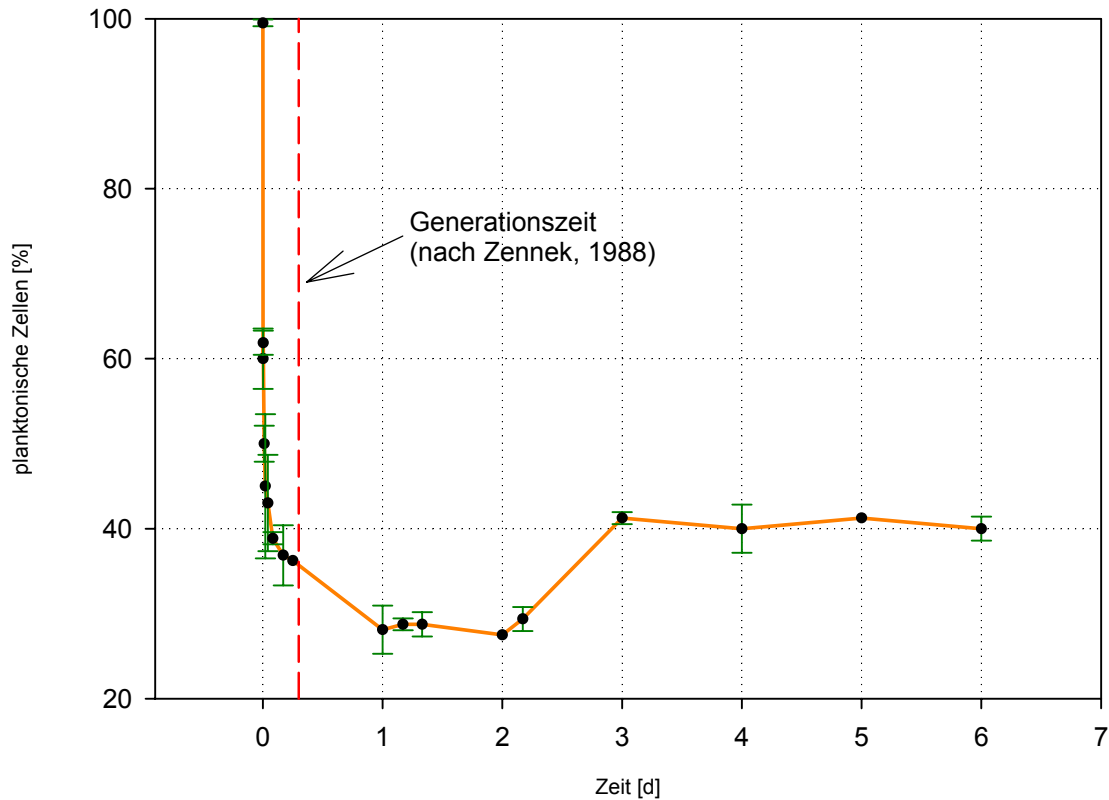


Abbildung 7: Zeitlicher Verlauf der Zellanheftung von Zellen des *A. ferrooxidans* Stammes R1 an Pyrit. Es ist die Abnahme der planktonischen Zellen dargestellt. Die Versuche wurden in Mineralsalzlösung mit 10% Substratum (w/v) durchgeführt. Das Inokulum betrug 1×10^{10} Zellen/mL die sich in der log-Phase befanden. Die Daten beruhen auf Mittelwerten zweier paralleler Ansätze. Die Versuche wurden bei einer Temperatur von 28°C durchgeführt, die Kulturen wurden auf einem Rundschüttler bei 120 UPM geschüttelt.

Der Stamm R1 hat eine Generationszeit von ca. 7,2 h (Zenek, 1988) beim Wachstum auf Eisen(II)-Ionen. Dieser Wert ist vermutlich beim Wachstum auf Pyrit erhöht. Ab einer Zeit von ungefähr 7 h kann keine verlässliche Angabe zur Zahl der sessilen Zellen mehr gemacht werden, da sich sowohl die planktonischen als auch die sessilen Zellen vermehren. Da in der Literatur keine Angaben über die Generationszeit für das Wachstum auf Pyrit für diesen Stamm vorliegen, wurde für die Inkubationszeit bis 7 Tage nur die Zahl der planktonischen Zellen bestimmt und somit deren Anheftung oder Zellzahlzunahme verfolgt. Dabei zeigte sich, dass die Zahl der planktonischen Zellen während der ersten Stunde von 100% auf einen

Wert von 50% abfällt. Danach folgt eine verlangsamte Abnahme bis auf einen Tiefstwert um 27% nach einem Tag. Die Zellzahl bleibt vorerst konstant und nimmt ab dem zweiten Tag, vermutlich aufgrund von Wachstum, wieder zu und erreicht einen Endwert von 40% nach 7 Tagen.

4.3 Ablösung sessiler Zellen von Pyrit

Im Rahmen dieser Untersuchungen wurde bestimmt, wie gut die an Pyrit angehefteten Zellen der Stämme *A. ferrooxidans* R1 und A2 mit Hilfe der vier Detergenzien Zwittergent, Tween 20, Tween 80 und Triton X-100 bei verschiedenen Einwirkzeiten und Konzentrationen ablösen. Auch wurde die Wirkung von (DTT) ist ein Reduktionsmittel. Es dient zur Spaltung von Disulfidbrücken zwischen Cystein-Resten, die störend bei der Sequenzierung oder der Aufreinigung von Proteinen auf Gel oder Säulen wirken. und Eisen(II)-Ionen auf die Ablösung von sessilen Zellen getestet. Basierend auf Ergebnisse, dieser Untersuchungen sollte dann geklärt werden, welche Wirkung die Detergenzien auf die EPS-Gewinnung haben, und ob eine Erhöhung der Zahl abgelöster Zellen auch eine Steigerung der EPS-Menge bedeutet. Die Ablösung sessiler Zellen von Pyrit wurde hauptsächlich mit den Zellen des Stammes *A. ferrooxidans* R1 und nur teilweise mit denen des Stammes A2 zur Überprüfung auf Stammspezifität durchgeführt. Die Wirkung der Detergenzien wird im Folgenden dargestellt.

4.3.1 Bedeutung der Konzentration und Einwirkzeit von Detergenzien

In dieser Versuchsreihe wurde die Wirkung der Detergenzien in den Konzentrationen, die bereits in der Tabelle 3.2 aufgeführt wurden, auf die Ablösung der Zellen geprüft. Das Ergebnis wird beispielhaft nur für das Detergenz Tween 20 dargestellt, da mit allen Detergenzien ähnliche Ergebnisse erzielt wurden. Die geringen Unterschiede der Ergebnisse liegen innerhalb des 20%-igen Fehlers bei der Zellzahlbestimmung. Die Abb. 4 zeigt die Zahlen der abgelösten Zellen pro g Pyrit nach der Behandlung der Erzpartikel mit einer detergentfreien Kontroll-Lösung.

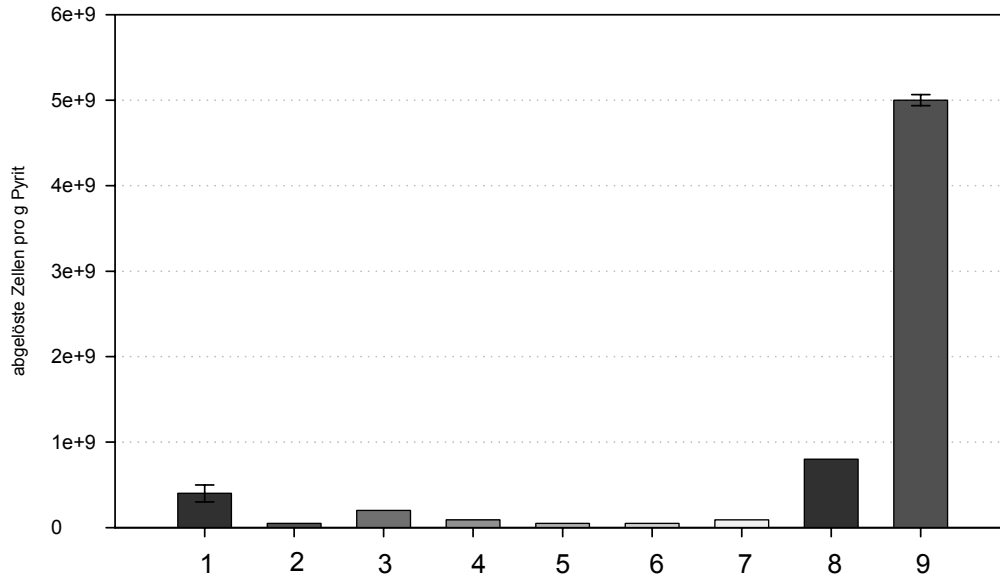


Abbildung 8: Ablösung sessiler Zellen des Stammes *A. ferrooxidans* R1 von Pyritpartikeln der Größe 50 bis 100 μm . Die Zahlen ergaben sich aus der Zellzahlbestimmung der abgelösten Zellen vom Pyrit nach Detergenz-Behandlung und Homogenisieren mit dem Ultra-Turrax. Als Inokulum dienten 1×10^{10} Zellen pro mL, die in einem 100 mL Erlenmeyerkolben in 50 mL Mineralsalzlösung eine Woche auf 10% Pyrit angezogen worden waren. Die Inkubation erfolgte bei 28°C im Dunkeln auf einem Rundschüttler (120 Upm). Es sind Mittelwerte dreier Versuchansätze gezeigt. Die Einwirkzeit betrug bei allen Ansätzen 30 min. Die Homogenisierungszeit betrug 3 bzw. 10 min (siehe Legende). I = Standardabweichung

Nr.	Detergenz	pH	Homogenisierungszeit in min
1	Tris/HCl-Puffer	7	3
2	Tris/HCl-Puffer	2	3
3	Tris/HCl-Puffer	7	0
4	Waschlösung	2	3
5	Waschlösung	2	0
6	Tris/HCl-Puffer	2	10
7	Tris/HCl-Puffer	7	10
8	Eisen(II)-Ionen	2	3
9	Tween 20	7	3

Aus Abb. 8 geht hervor, dass nach einer 30 minütigen Einwirkzeit von Tween 20 konnten 5×10^9 Zellen pro g Pyrit abgelöst werden. Durch den Einsatz von Wasch-, Puffer- und Eisen(II)-Lösungen ohne ein Detergenz wurden lediglich zwischen 0,6 und 10 % der Zellen abgelöst, die durch den Zusatz von Tween 20 abgelöst werden konnten.

Alle Ansätze wurden 30 min inkubiert und anschließend 3 min homogenisiert. Die EPS der abgelösten Zellen wurden anschließend von diesen durch Zentrifugation getrennt. Bei der Bestimmung von KDO im zellfreien Überstand konnten kein KDO detektiert werden. Das bedeutet, dass durch die Bearbeitung der sessilen Zellen mit dem Detergenz bzw. dem

detergenzfreien Kontroll-Lösung die Zellen nicht lysierten und daher keine Zellwandreste im Zellfreien Überstand zu finden waren. Die Kohlenhydratbestimmung ergab nach der Bearbeitung der sessilen Zellen mit Tween 20 nach 30 min Einwirkzeit einen Wert von 1×10^{-9} mg pro Zelle. Es konnten also nach der 30 minütigen Einwirkzeit mit Tween 20 eine EPS-Menge von 10^{-9} mg pro Zelle gewonnen werden.

4.3.1.1 Bedeutung der Einwirkzeit bei der Ablösung von Zellen von *A. ferrooxidans* vom Pyrit

In der Abbildung 9 wird die Zahl der abgelösten Zellen nach unterschiedlichen Einwirkzeiten der Detergenzien beispielhaft für Tween 20 dargestellt.

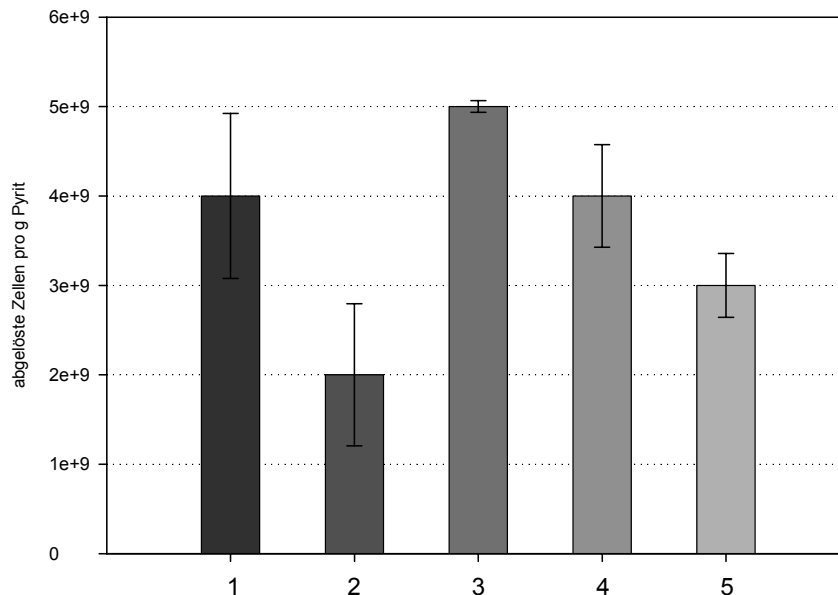


Abbildung 9: Ablösung sessiler Zellen des Stammes *A. ferrooxidans* R1 von Pyritpartikeln der Größe 50 bis 100 μm . Die Zahlen ergaben sich aus der Zellzahlbestimmung der abgelösten Zellen vom Pyrit nach Detergenz-Behandlung und Homogenisieren mit dem Ultra-Turrax. Als Inokulum dienten 1×10^{10} Zellen pro mL, die in einem 100 mL Erlenmeyerkolben in 50 mL Mineralsalzlösung eine Woche auf Pyrit (10% bezogen auf das Inokulum w/v) angezogen worden waren. Die Inkubation erfolgte bei 28°C im Dunkeln auf einem Rundschüttler (120 Upm). Es sind Mittelwerte dreier Versuchansätze gezeigt. Die Einwirkzeit betrug bei allen Ansätzen 30 min. Die Homogenisierungszeit betrug 3 bzw. 10 min (siehe Legende). I = Standardabweichung.

Nr.	Detergenz	pH	Homogenisierungszeit in min
1	Tween 20	7	15
2	Tween 20	7	20
3	Tween 20	7	30
4	Tween 20	7	45
5	Tween 20	7	60

Die Zahl der durch Tween 20 vom Pyrit abgelösten Zellen schwankt zwischen 2×10^9 Zellen pro g Pyrit nach 20 min und 5×10^9 Zellen pro g Pyrit nach 30 min Einwirkzeit. Die Versuche

zur Zellablösung mit den anderen Detergenzien Zwittergent, Tween 80 und Triton X-100 ergaben ähnliche Werte (innerhalb des Zählfehlers von 20%).

In dem zellfreien Überstand konnte kein KDO detektiert werden. Somit ist davon auszugehen, dass sich in diesem keine Zellwandreste befanden. Der Befund lässt den Schluss zu, dass durch die Ablösungsprozedur die angehefteten Zellen nicht zerstört wurden. Die Kohlenhydratbestimmung als Nachweis für EPS fiel positiv aus und ergab für die 30 minütige Einwirkzeit 1×10^{-9} mg pro Zelle. Andere Einwirkzeiten und Detergenzien ergaben Werte zwischen 9×10^{-10} und 2×10^{-9} mg pro Zelle. Diese Werte sind bei Berücksichtigung des Messfehlers für abgelöste Zellen im Überstand, als etwa gleich zu betrachten (~20%, Zahl wird zur Berechnung der Kohlenhydratmenge pro Zelle benötigt). Die Werte für die Kohlenhydratbestimmungen waren bei allen Versuchen etwa gleich und werden daher bei folgenden Versuchen nicht wiederholt.

4.3.1.2 Bedeutung der Homogenisierungsdauer

Mit diesem Versuch sollte geklärt werden, ob durch eine längere Homogenisierungszeit eine Erhöhung der Zahl der vom Pyrit abgelösten Zellen erreicht werden kann. Daher wurde die bewachsenen Pyritpartikel nach Zusatz der vier Detergenzien für die Dauer von 3 und 10 min homogenisiert. In Abb. 10 sind die Werte aufgetragen, die sich aus diesem Versuch ergaben.

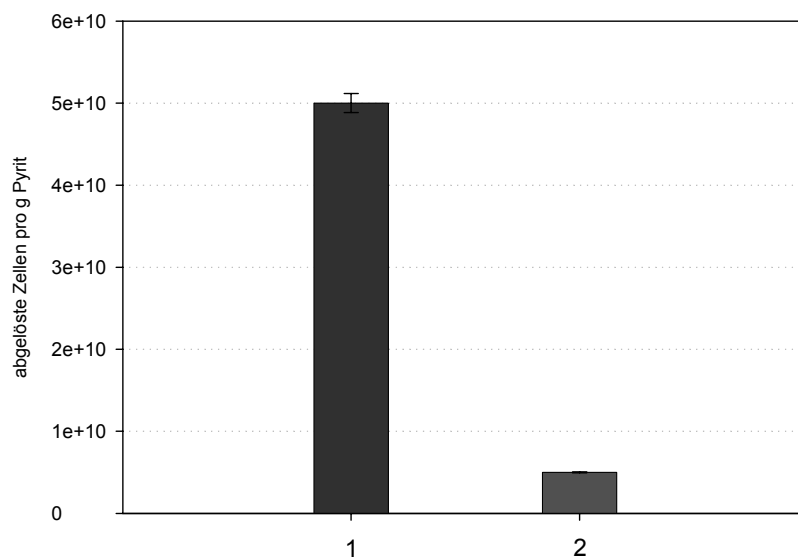


Abbildung 10: Ablösung sessiler Zellen von *A. ferrooxidans* Stamm R1 mit Zusatz von Tween 20 nach einer Homogenisierungszeit von 3 und 10 min von Pyritpartikeln der Größe 50 bis 100 μm . Als Inokulum dienten 1×10^{10} Zellen pro mL, die in einem 100 mL Erlenmeyerkolben in 50 mL Mineralsalzlösung eine Woche auf 10% (w/v) Pyrit angezogen wurden. Die Inkubation erfolgte bei 28°C im Dunkeln auf einem Rundschüttler (120 Upm). Die Zahlen ergaben sich aus der Zellzahlbestimmung der abgelösten Zellen vom Pyrit nach Detergenz-Behandlung und Homogenisieren mit dem Ultra-Turrax. Es sind Mittelwerte von mindestens zwei Versuchansätzen gezeigt. Die

Detergenzien-Einwirkzeit betrug bei diesem Versuch 30 min. Die Konzentration beträgt 0,1% (v/v). I = Standardabweichung

Nr.	Detergenz	pH	Homogenisierungszeit in min
1	Tween 20	7	10
2	Tween 20	7	3

Während durch die 3-minütige Homogenisierung 5×10^9 Zellen pro g Pyrit abgelöst wurden, wurde durch die Erhöhung der Dauer der Homogenisierung auf 10 min die Zahl der abgelösten Zellen auf 5×10^{10} pro g Pyrit erhöht. Dies entspricht einer 10 fachen Erhöhung. In keinem der zellfreien EPS-Überstände nach Behandlung mit einem der vier Detergenzien konnte KDO und somit Zelltrümmer nachgewiesen werden. Die Erhöhung der Homogenisierungsdauer bewirkte bei den anderen Detergenzien ebenfalls eine ähnliche Erhöhung der Ablösung der Zellen vom Pyrit (im Rahmen des 20%igen Messfehlers bei der Zellzahlbestimmung). Eine Erhöhung der Homogenisierungszeit bringt also die erhoffte Erhöhung der abgelösten Zellzahl.

4.3.1.3 Bedeutung der Detergenzkonzentration

Um zu prüfen, ob eine Erhöhung der Konzentration der Detergenzien ihre Wirksamkeit beeinflusst, wurden alle Detergenzien bei einer Einsatzkonzentration von 1,5% getestet. Die Ergebnisse werden am Beispiel von Tween 20 in der Abb. 11 dargestellt.

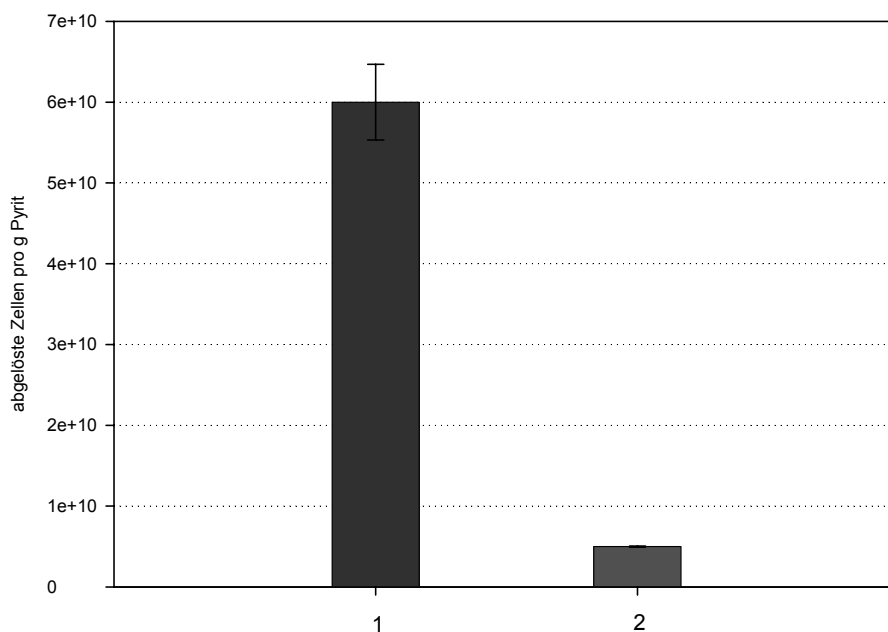


Abbildung 11: Ablösung sessiler Zellen des Stammes *A. ferrooxidans* R1 mit 15 mL Tween 20, **1:** 1,5- und **2:** 0,1%-ig (v/v) vom Pyritpartikeln der Größe 50 bis 100 μm . Als Inokulum dienen 1×10^{10} Zellen pro mL, die in einem 100 mL Erlenmeyerkolben in 50 mL Mineralsalzlösung eine Woche auf 10% (w/v) Pyrit angezogen wurden.

Die Inkubation erfolgte bei 28°C im Dunkeln auf einem Rundschtüttler (120 Upm). Die Zahlen ergaben sich aus der Zellzahlbestimmung der abgelösten Zellen vom Pyrit nach Detergenz-Behandlung und Homogenisieren mit dem Ultra-Turrax. Es sind Mittelwerte dreier Versuchansätze gezeigt. Die Detergenzien-Einwirkzeit betrug bei diesem Versuch 30 min. I = Standardabweichung

Nr.	Detergenz	pH	Einsatzkonzentration in %	Homogenisierungszeit in min
1	Tween 20	7	1,5	30
2	Tween 20	7	0,1	30

Ein Vergleich der beiden Werte zeigt, dass durch die Erhöhung der Konzentration von Tween 20 auf 1,5% die Zahl der abgelösten Zellen vom Pyrit einen Wert von 6×10^{10} pro g Pyrit erreichte, während mit der 0,1 Tween 20 nur 5×10^9 Zellen pro g Pyrit abgelöst wurden. Dies entsprach einer ca. 10 fachen Erhöhung.

Auch bei diesem Versuch konnte kein KDO detektiert werden, die Rückschlüsse auf zerstörte Zellen zugelassen hätten. Die mit Hilfe der anderen Detergenzien Zwittergent, Tween 80 und Triton X-100 gewonnen Zellzahlen waren ähnlich hoch und konnte somit als gleichwertig erachtet werden. Die ist bei der Ablösung der Zellen Die Verwendung der 1,5-igen Detergenzien erhöht also die Zahl der abgelösten Zellen vom Pyrit.

4.3.1.4 Kombination von langer Homogenisierungszeit und hoher Detergenzkonzentration

Im Folgenden wurde eine Kombination der beiden Faktoren Erhöhung der Konzentration der Detergenzien auf 1,5% und Verlängerung der Homogenisierungszeit auf 10 min auf die Zellablösung geprüft. Da die jeweilige Veränderung dieser Faktoren zur Erhöhung der Zahl der abgelösten Zellen geführt hat, ist die Möglichkeit gegeben, dass eine Kombination dieser Veränderungen den positiven Effekt verstärken könnte. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in der Abb. 8 dargestellt.

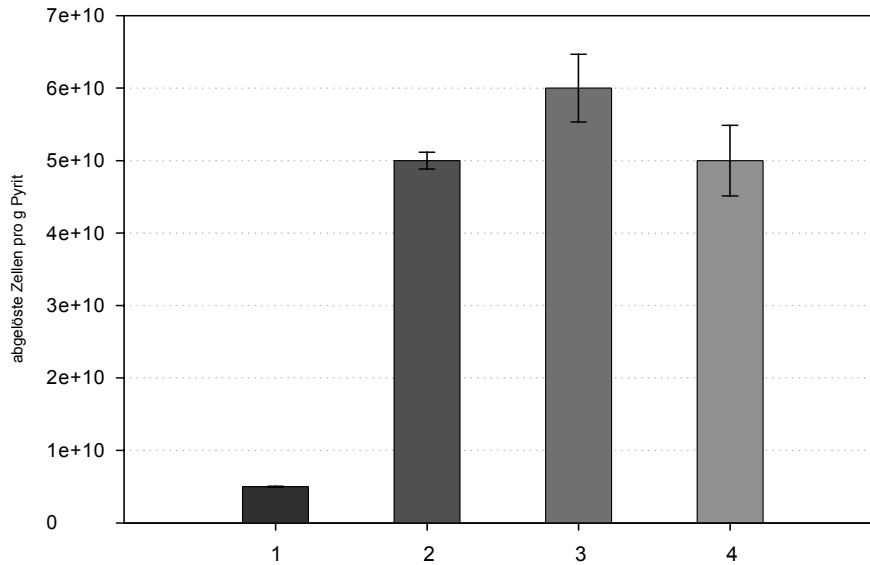


Abbildung 12: Ablösung sessiler Zellen des Stammes *A. ferrooxidans* R1 mit Tween 20 nach 2: Erhöhung der Homogenisierungszeit auf 10 und 3: Konzentration auf 1,5% und der min im Vergleich zu 1: 0,1%-igem Tween 20 und Homogenisierungsdauer von 3 bzw. 10 min von Pyritpartikeln der Größe 50 bis 100 μm . Die Zahlen ergaben sich aus der Zellzahlbestimmung der abgelösten Zellen vom Pyrit nach Detergenz-Behandlung und Homogenisieren mit dem Ultra-Turrax. Als Inokulum dienten 1×10^{10} Zellen pro mL, die in einem 100 mL Erlenmeyerkolben in 50 mL Mineralsalzlösung eine Woche auf 10% Pyrit (w/v) angezogen wurden. Die Inkubation erfolgte bei 28°C im Dunkeln auf einem Rundschüttler (120 Upm). Es sind Mittelwerte von mindestens zwei Versuchansätzen gezeigt. Die Einwirkzeit des Detergenz betrug bei diesem Versuch 30 min. I = Standardabweichung

Nr.	Detergenz	pH	Einsatzkonzentration in %	Homogenisierungszeit in min
1	Tween 20	7	0,1	3
2	Tween 20	7	0,1	10
3	Tween 20	7	1,5	3
4	Tween 20	7	1,5	10

Durch die Erhöhung der Homogenisierungszeit und 1,5% Tween 20 konnten pro g Pyrit 5×10^{10} Zellen abgelöst werden. Bei der Behandlung des bewachsenen Pyrits mit der gleichen Detergenzkonzentration und 3 minütiger Homogenisierungsdauer wurden 6×10^{10} Zellen pro g Pyrit abgelöst. Somit konnte kein signifikanter Unterschied zwischen 3 und 10 min Homogenisierungsdauer festgestellt werden. Der KDO-Nachweis fiel bei allen Versuchansätzen negativ aus. Alle anderen Detergenzien lieferten ähnliche Ergebnisse und daher sind die Werte nicht dargestellt. Die abgelöste Zellzahl bei den Balken 2 und 4 (S. Legende) fallen gleich aus. Der Balken 1 zeigt die niedrigste abgelöste Zellzahl.

4.3.2 Effekt von Eisen(II)-Ionen

Es sollte geprüft werden, ob der Zusatz von Eisen(II)-Ionen einen steigernden Effekt auf die Ablösung der Zellen des Stammes *A. ferrooxidans* R1 von Pyrit aufweist. Für diesen Versuch

wurde eine Detergenz-Eisen(II)-Ionen-Lösung hergestellt, deren Endkonzentration an Eisen(II)-Ionen 0,03% betrug. Die Eisen(II)-Ionen wurden allen vier Detergenzien zugesetzt. Der pH dieser Lösung wurde zwischen 2 und 2,5 eingestellt, damit die Eisen(II)-Ionen in der Lösung stabil bleiben. Die Wirkung des niedrigen pHs auf die Zellablösung wurde anhand eines sauren Tris-HCl-Puffers (pH 2) kontrolliert, in dem der Puffer anstelle des Detergenz für die Ablösung der Zellen verwendet wurde. Das Ergebnis ist unter 4.3.1 am Beispiel von Tween 20 dargestellt.

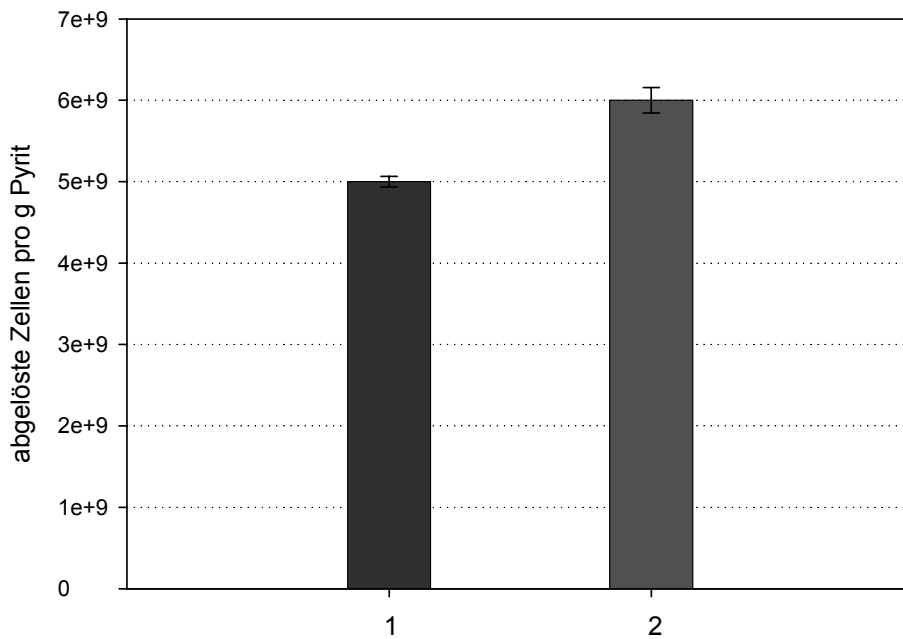


Abbildung 13: Ablösung sessiler Zellen des Stammes R1 mit 1: 0,1%-igem Tween 20 im Vergleich zu 2: 0,1%-igem Tween 20 und Eisen(II)-Ionen. Die Homogenisierungsdauer betrug 3 min. Die Zahlen ergaben sich aus der Zellzahlbestimmung der abgelösten Zellen vom Pyritpartikeln der Größe 50 bis 100 μm . Als Inokulum dienten 1×10^{10} Zellen pro mL, die in einem 100 mL Erlenmeyerkolben in 50 mL Mineralsalzlösung eine Woche auf 10% Pyrit (w/v) angezogen wurden. Die Inkubation erfolgte bei 28°C im Dunkeln auf einem Rundschüttler (120 Upm). Es sind Mittelwerte von mindestens zwei Versuchansätzen gezeigt. Die Einwirkzeit der Detergenzien betrug bei diesem Versuch 30 min. I = Standardabweichung

Nr.	Detergenz	pH	Einsatzkonzentration in %	Homogenisierungszeit in min
1	Tween 20	7	0,1	30
2	Tween 20 +	7	0,1	30

Nach der Zugabe von Eisen(II)-Ionen in die Detergenzienlösung konnten nach einer Einwirkzeit von 30 min 6×10^9 Zellen pro g Pyrit abgelöst werden, während ohne Zusatz von Eisen(II)-Ionen nach 30 min 5×10^9 Zellen pro g Pyrit abgelöst werden konnten. Durch den Zusatz von Eisen(II)-Ionen zum Detergenz mit erhöhter Konzentration konnten 4×10^{10} Zellen pro g vom Pyrit abgelöst werden (nicht dargestellt). Das Detergenz ohne Eisen(II)-Ionen löste 5×10^9 Zellen pro g Pyrit nach 30 min (nicht dargestellt). Nach der Erhöhung der Homogenisierungsdauer von 3 min auf 10 min wurden 6×10^{10} Zellen pro g Pyrit abgelöst

(Ergebnisse nicht dargestellt). Auch eine Erhöhung der Einwirkzeit auf 45 min bewirkte sowohl bei 0,1% als auch bei 1,5% Detergenz mit Zusatz von Eisen(II)-Ionen und den unterschiedlichen Homogenisierungszeiten die Ablösung ähnlich hoher Zellzahlen, wie oben angegeben. Die KDO-Bestimmung fiel bei allen Versuchen negativ aus. Somit konnten keine Zellwandreste im zellfreien Überstand detektiert werden. Auch hier waren die Ergebnisse der Versuchsreihen mit den anderen Detergenzien ähnlich (im Rahmen des 20%igen Messfehlers bei der Zellzahlbestimmung). Daher werden nur die Ergebnisse von Tween 20 beispielhaft aufgeführt. Die Zugabe von Eisen(II)-Ionen zu den Detergenzienlösungen erhöhte die Zahl der abgelösten Zellen vom Pyrit nicht.

4.3.3 Ablösungen der Zellen in 1 L-Kolben

In der folgenden Abb. 12 werden die Zahlen der abgelösten Zellen nach unterschiedlichen Einwirkzeiten der Detergenzien mit und ohne Zusatz von Eisen(II)-Ionen beispielhaft für Tween 20 dargestellt. Bei den anderen Detergenzien Zwittergent, Tween 80 und Triton X-100 ergaben sich ähnliche Werte, so dass auf deren Darstellung verzichtet werden konnte.

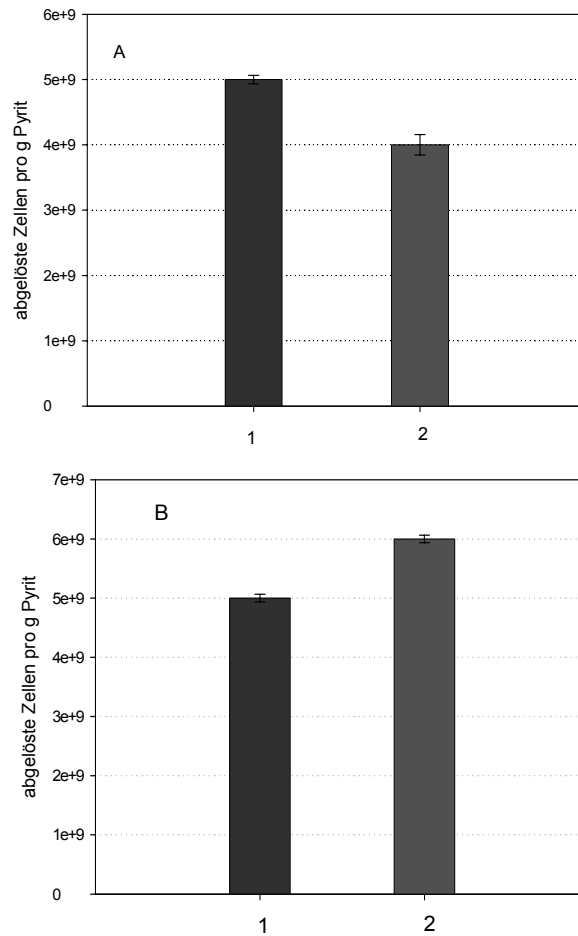


Abbildung 14: Ablösung sessiler Zellen des Stammes R1 mit Tween 20 bei den **A:** 1L-Erlenmeyerkolben zur EPS-Gewinnung (A) im Vergleich zu **B:** 100 mL Kolben. Die Zahlen ergaben sich aus der Zellzahlbestimmung der abgelösten Zellen von Pyritpartikeln der Größe 50 bis 100 μm . Die Homogenisierungszeit betrug 3 min bei allen Ansätzen. Als Inokulum dienten 1×10^{10} Zellen pro mL, die in einem 1 L Erlenmeyerkolben eine Woche auf 10% Pyrit (w/v) angezogen wurden. Die Inkubation erfolgte bei 28°C im Dunkeln auf einem Rundschtüttler (120 Upm). I = Standardabweichung

Nr.	Detergenz	pH	Stamm	Inkubationszeit in min	Endkonzentration in %
1	Tween20	7	R1	30	0,1
2	Tween 20 +	7	R1	30	0,1

Während bei Einwirkzeiten von 30 und 45 min und der Konzentration von 0,1% Tween 20 jeweils 5×10^9 bzw. 2×10^9 Zellen pro g Pyrit abgelöst wurden, betrug die abgelöste Zellzahl

durch die erhöhte Konzentration von Tween 20 bei einer Einwirkzeit von 30 min 5×10^{10} Zellen pro g Pyrit. Bei Tween 20 mit Zusatz von Eisen(II)-Ionen wurden 4×10^9 Zellen pro g Pyrit abgelöst. Es waren keine signifikanten Unterschiede zwischen den Zahlen der abgelösten Zellen aus den verschiedenen Anzuchtskolben (100mL und 1L) feststellbar. Durch KDO-Bestimmung konnte kein LPS-Rest im zellfreien Überstand detektiert werden.

4.3.4 Ablösung von Zellen des Stammes *A. ferrooxidans* A2 von Pyrit

Zur Prüfung der Verfahrensschritte bei der Zellablösung auf eventuelle stammspezifische Ergebnisse, wurden mit den vier Detergenzien auch die Zellen des Stammes *A. ferrooxidans* A2 vom Pyrit getestet. Dabei wurden die Ansätze für 30 oder 45 min mit den Detergenzien inkubiert und 3 min homogenisiert. Die Abb. 10 zeigt die Werte am Beispiel von Tween 20. Auch hier wurde eine KDO-Bestimmung für jeden Ansatz durchgeführt, um eventuelle Zellwandreste in dem zellfreien Überstand zu detektieren.

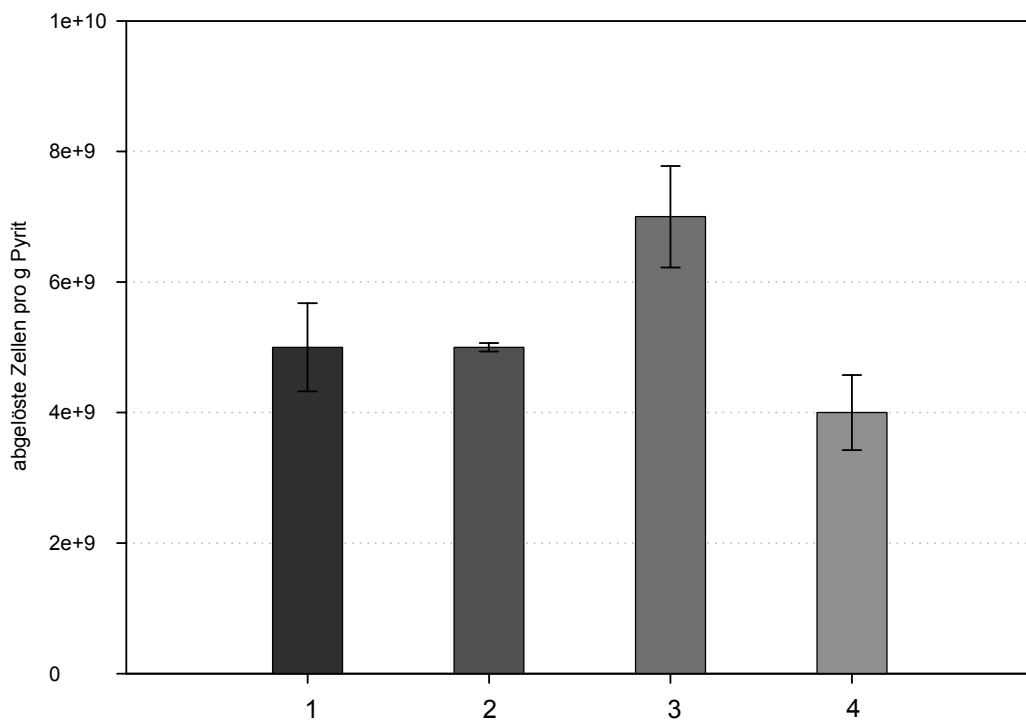


Abbildung 15: Vergleich der Ablösung sessiler Zellen der Stämme *A. ferrooxidans* 1 und 3: A2 und 2 und 4: R1 mit Tween 20 von Pyrit nach verschiedenen Einwirkzeiten des Detergenz. Die Zahlen ergaben sich aus der Zellzahlbestimmung der abgelösten Zellen von Pyritpartikeln der Größe 50 bis 100 μm . Die Homogenisierungszeit beträgt 3 min. Als Inokulum dienten 1×10^{10} Zellen pro mL, die in einem 100 mL Erlenmeyerkolben in 50 mL Mineralsalzlösung eine Woche auf 10% Pyrit (w/v) angezogen wurden. Die Inkubation erfolgte bei 28°C im Dunkeln auf einem Rundschüttler (120 Upm). Es sind Mittelwerte dreier Versuchansätze gezeigt. I = Standardabweichung

Nr.	Detergenz	pH	Stamm	Homogenisierungszeit in min
1	Tween 20	7	A2	30
2	Tween 20	7	R1	30
3	Tween 20	7	A2	45
4	Tween 20	7	R1	45

Durch die Inkubation der Zellen des Stammes *A. ferrooxidans* A2 mit Tween 20 konnten nach 30 min 5×10^9 und nach 45 min 7×10^9 Zellen pro g Pyrit bei einer Homogenisierungsdauer von 3 min abgelöst werden. Die gleiche Behandlung löste von Stamm R1 nach 30 min 5×10^9 Zellen pro g Pyrit und nach 45 min 4×10^9 Zellen pro g Pyrit ab. Die KDO-Bestimmung fiel negativ aus. Der Vergleich der Ablösung beider Stämme R1 und A2 zeigte, dass die Zahl der abgelösten Zellen vom Pyrit unter gleichen Umständen der Behandlung gleich ausfällt.

4.3.5 Wirkung von Ditherythrit auf die Zellablösung

Dithioerythritl (DTT) wurde eingesetzt, um dessen Wirkung als reduzierendes Agenz auf das Ablösen der Zellen vom Pyrit zu überprüfen. Es wurde eine 0,07% (persönliche Mitteilung Sand) Lösung eingesetzt. Die Wirkung des Agenz wurde in Abhängigkeit der Einwirkzeit auf Ablösung sessiler Zellen getestet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 11 dargestellt.

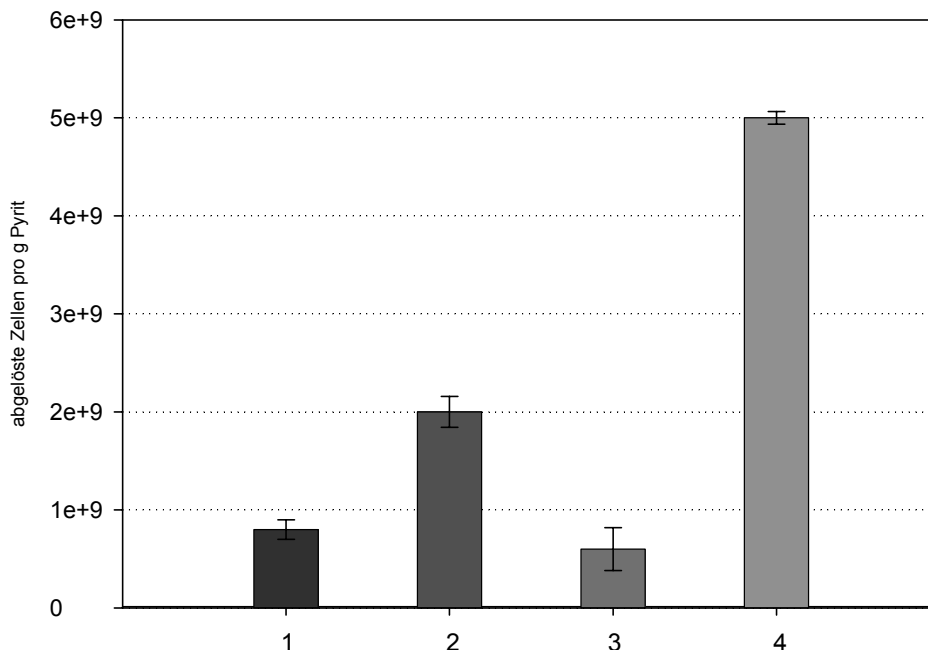


Abbildung 16: Gewinnung sessiler Zellen des Stammes *A. ferrooxidans* R1 mit **1, 2 und 3:** Dithioerythrit. Die Zahlen ergaben sich aus der Zellzahlbestimmung der abgelösten Zellen von Pyritpartikeln der Größe 50 bis 100 μm . Die Homogenisierungszeit betrug 3 min. Als Inokulum dienten 1×10^{10} Zellen pro mL, die in einem 100 mL Erlenmeyerkolben in 50 mL Mineralsalzlösung eine Woche auf 10% Pyrit (w/v) angezogen wurden. Die

Inkubation erfolgte bei 28°C im Dunkeln auf einem Rundschtüttler (120 Upm). Es sind Mittelwerte dreier Versuchansätze gezeigt. I = Standardabweichung

Nr.	Detergenz	pH	Stamm	Inkubationszeit in min	Homogenisierungszeit in min
1	DTT	7	R1	15	3
2	DTT	7	R1	30	3
2	DTT	7	R1	60	3
3	Tween 20	7	R1	30	3

Nach einer Einwirkzeit von 15 min wurde ein Zellertrag von 8×10^8 , nach 30 min von 2×10^9 und nach 60 min von 6×10^8 Zellen pro g bewachsenem Pyrit erreicht. Die Inkubation mit Tween 20 erbrachte dagegen nach 30 min einen Ertrag von 5×10^9 Zellen. Nach 15 und 45 min wurden mit Tween 20 jeweils 4×10^9 Zellen abgelöst (Daten nicht dargestellt). Bei der KDO-Bestimmung Zellwandreste detektiert (ca. 13 μg KDO/mL Überstand). Bezogen auf 5×10^{11} Zellen wären maximal 42,5 μg KDO detektierbar gewesen (Gehrke, 1998). Mit 13 μg wurden hier 30% der detektierbaren Menge an KDO im zellfreien Überstand gefunden. Diese Menge kann nicht ohne weiteres vernachlässigt werden. Die Verwendung von DTT ist daher für die Ablösung der Zellen nicht geeignet, da auch eine Erhöhung der Zahl der abgelösten Zellen vom Pyrit im Vergleich zu den Detergenzien ausblieb.

4.4 Gewinnung von EPS

Bei den Versuchen zur Gewinnung von EPS sollte festgestellt werden, welches der Detergenzien den besten EPS-Ertrag liefert und ob die EPS-Menge mit der Zahl der abgelösten Zellen zunimmt. Hierbei wurden einfach konzentrierte Detergenzien und solche mit Zusatz von Eisen(II)-Ionen benutzt. Diese Versuche wurden beispielhaft an den Zellen von *A. ferrooxidans* Stamm R1 durchgeführt.

4.4.1 Bedeutung der Einwirkzeit bei der Gewinnung von EPS der Zellen von *A. ferrooxidans*

Abbildung 13 zeigt die Werte für die Menge an EPS, die nach Behandlung mit verschiedenen Detergenzien nach unterschiedlichen Einwirkzeiten gewonnen wurde.

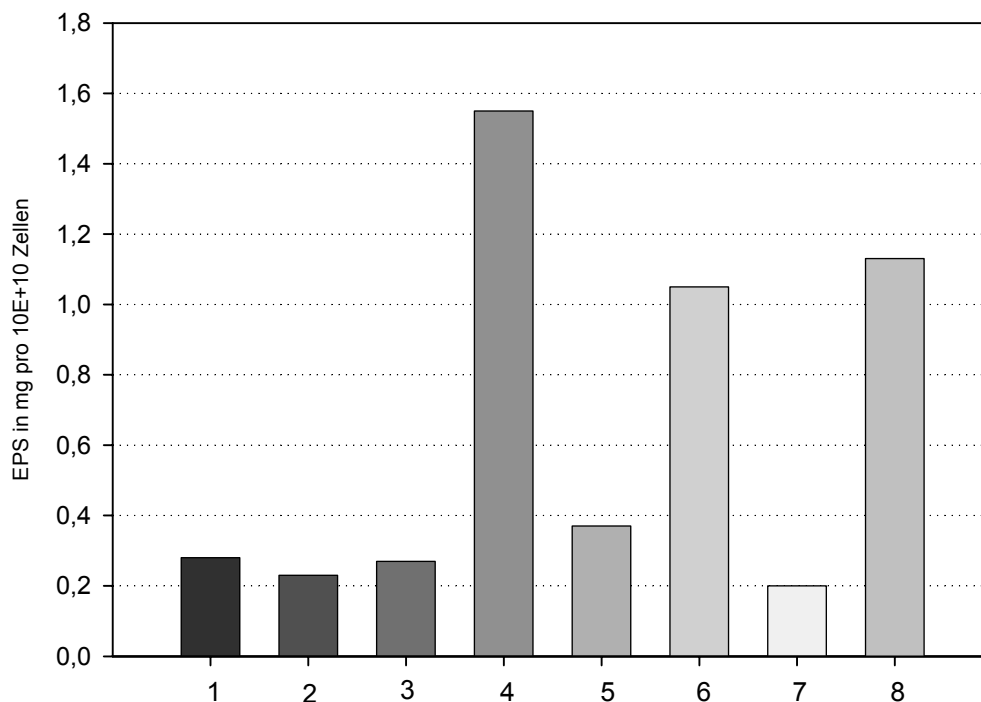


Abbildung 17: Gewinnung von EPS nach Behandlung von Pyritpartikeln der Größe 50 bis 100 μm mit verschiedenen Detergenzien. Als Inokulum dienten 5×10^{12} Zellen des Stammes R1, die in 500 mL Mineralsalzlösung eine Woche auf 10% Pyrit (w/v) angezogen wurden. Die Inkubation erfolgte bei 28°C im Dunkeln.

Nr.	Detergenz	pH	Einsatzkonzentration in %	Inkubationsdauer
1	Zwittergent	7	0,001	30
2	Zwittergent	7	0,001	45
3	Tween 20	7	0,1	30
4	Tween 20	7	0,1	45
5	Tween 80	7	0,001	30
6	Tween 80	7	0,001	45
7	Triton X-100	7	0,05	30
8	Triton X-100	7	0,05	45

Mit Hilfe von Zwittergent wurden nach 30 min Einwirkzeit 0,28 mg EPS pro 10^{10} Zellen und nach 45 min Einwirkzeit 0,23 mg EPS pro 10^{10} Zellen gewonnen. Unter den gleichen Bedingungen wurden mit Tween 20 eine EPS-Menge von 0,27 bzw. 1,55 mg pro 10^{10} Zellen gewonnen. Die EPS-Ernte fiel bei Tween 20 nach 45 min Einwirkzeit also um einen Faktor von 6 höher als die Ernten nach 30 minütiger Einwirkzeit aus, während beim Zusatz von Zwittergent kein nennenswerter Unterschied messbar war.

Die EPS-Gewinnung in Gegenwart von Tween 80 fiel folgendermaßen aus: Nach 30 min wurden 0,37 mg und nach 45 min 1,05 mg EPS pro 10^{10} Zellen erhalten. Dies entspricht einer Erhöhung der Menge EPS um einen Faktor von 3 durch die längere Einwirkzeit. Mit Hilfe von Triton X-100 wurden nach 30 min 0,2 und nach 45 min 1,13 mg EPS von 10^{10} Zellen gewonnen. Die EPS-Menge, die nach 45 min Einwirkzeit gewonnen werden konnte, war somit um Faktor fast 6 höher als die Menge nach 30 min.

In keinem dieser EPS-Ansätze konnte LPS detektiert werden. Somit war die EPS trotz der vielen Versuchsschritte nicht durch Zellwandreste kontaminiert.

4.4.2 Effekt von Eisen(II)-Ionen bei der Gewinnung von EPS

Zur Prüfung der Effektivität des Zusatzes von Eisen-II-Ionen wurden die Detergenzien Zwittergent und Tween 20 ausgewählt. Auch hier wurde eine Detergenz-Eisen(II)-Ionen-Lösung hergestellt, in der die Endkonzentration an Eisen(II)-Ionen 0,03% betrug.

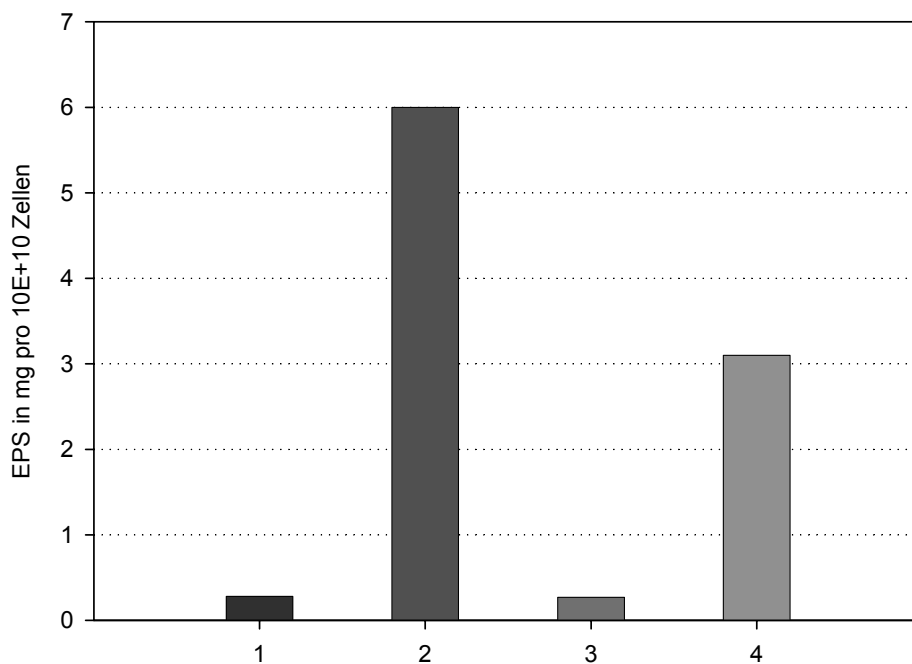


Abbildung 18: Gewinnung von EPS nach Behandlung von Pyritpartikeln der Größe 50 bis 100 μm nach Zusatz von Eisen(II)-Ionen in die Detergenzien.. Als Inokulum dienten 5×10^{12} Zellen des Stammes R1, die in 500 mL Mineralsalzlösung eine Woche auf 10% Pyrit (w/v) angezogen wurden. Die Inkubation erfolgte bei 28°C im Dunkeln.

Nr.	Detergenz	pH	Einsatzkonzentration in %	Inkubationsdauer
1	Zwittergent	7	0,001	30
2	Zwittergent+ Eisen-II-Ionen	7	0,001	45
3	Tween 20	7	0,1	30
4	Tween 20+ Eisen-II-Ionen	7	0,1	45

Durch die Zugabe von Eisen(II)-Ionen in die Zwittergent-Lösung wurden 6 mg EPS pro 10^{10} gewonnen. Dies bedeutet eine Erhöhung der Menge von EPS um einen Faktor 21 im Vergleich zu der Menge an EPS (0,28 mg pro 10^{10} Zellen), welche ohne Zusatz von Eisen(II)-Ionen gewonnen wurde. Die Menge an gewinnbaren EPS bei Tween 20 nach der Zugabe von Eisen(II)-Ionen beträgt 3,1 mg pro 10^{10} Zellen, welche eine Erhöhung dieser Menge im Vergleich der Gewinnung der EPS nach Behandlung der sessilen Zellen mit reiner Detergenzienlösung (0,27 mg pro 10^{10} Zellen) um einen Faktor von 11 bedeutet. Es kann also eine beträchtliche Erhöhung der gewinnbaren EPS-Menge nach diesen Versuchen beobachtet werden.

4.4.3 Effekt der Konzentration von Detergenzen auf Gewinnung von EPS

Auch bei den Ansätzen zur EPS-Gewinnung wurden die Detergenzien ebenfalls in erhöhter Konzentration getestet, um den Effekt auf die bei der EPS-Gewinnung zu prüfen. Hierfür wurden die Detergenzien Zwittergent und Tween 20 in einer Konzentration von 1,5% eingesetzt.

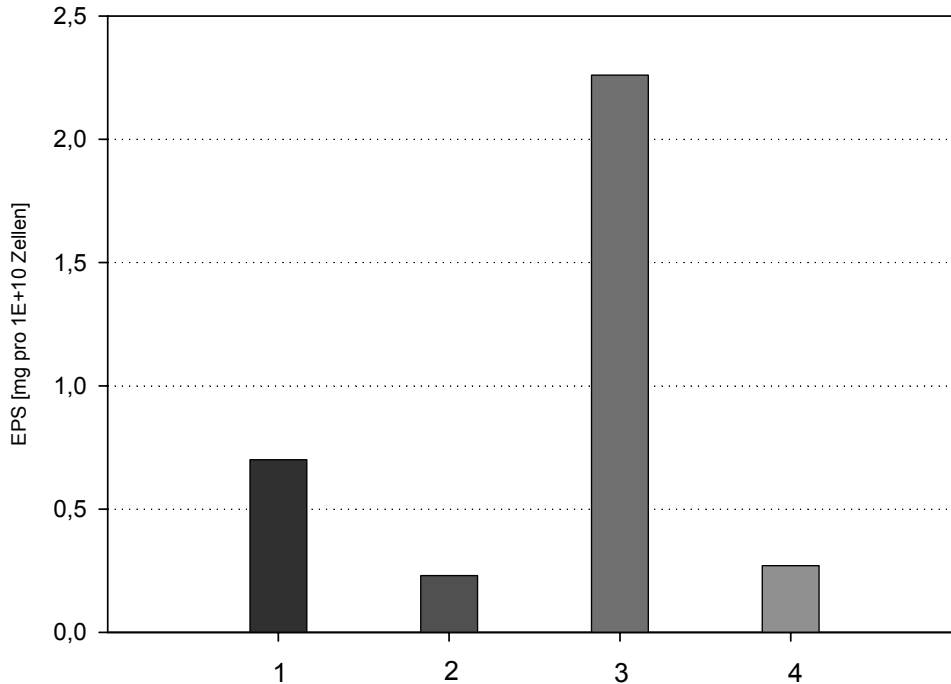


Abbildung 19: Gewinnung von EPS nach Behandlung von Pyritpartikeln der Größe 50 bis 100 µm nach Konzentrierung des **1 und 2:** Zwittergent und **3 und 4:** Tween 20. Als Inokulum dienten 5×10^{12} Zellen des Stammes R1, die in 500 mL Mineralsalzlösung eine Woche auf 10% Pyrit (w/v) angezogen wurden. Die Inkubation erfolgte bei 28°C im Dunkeln.

Nr.	Detergenz	pH	Stamm	Inkubationszeit in min	Endkonzentration in %
1	Zwittergent	7	R1	30	1,5
2	Zwittergent	7	R1	45	0,03
3	Tween 20	7	R1	30	1,5
4	Tween 20	7	R1	30	0,1

Durch die 30 minütigen Bearbeitung der sessilen Zellen mit 1,5%-igem Zwittergent konnten 0,7 mg EPS pro 10^{10} Zellen gewonnen werden. Dies entsprach einer erhöhten EPS-Menge um Faktor 2,5 gegenüber Bearbeitung der Zellen mit 0,03%-igem Zwittergent für 30 min, welche einen EPS-Ertrag von 0,23 mg pro 10^{10} Zellen ergab.

Bei Behandlung der Zellen mit einer Lösung von 1,5% Tween 20 erhöhte sich die EPS-Menge um einen Faktor von 8,4. Bei der höher konzentrierten EPS-Lösung wurden 2,26 mg EPS pro 10^{10} Zellen gewogen. Bei der 0,1%-igen Tween 20-Lösung betrug diese Menge 0,27 mg. Im Vergleich zu den Mengen an EPS nach der Bearbeitung der sessilen Zellen mit Detergenzien erhöhter Konzentration ist die Menge an EPS merklich gestiegen.

5. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, welches der vier Detergenzien Zwittergent, Triton X-100, Tween 20 oder Tween 80 sessile Zellen der Art *A. ferrooxidans* am besten von Pyritpartikel ablöst. Anknüpfend an diese Ergebnisse sollte darüber hinaus das effektivste Detergenz zur EPS-Gewinnung ermittelt werden. Dabei war zu beachten, dass die Methoden zur Zellablösung und EPS-Gewinnung wie Einsatz von Detergenzien, Homogenisierung mit Ultra-Turrax und Zentrifugation die Zellen möglicherweise beschädigen, so dass die EPS in der Folge mit LPS-Resten und Zellinhaltsstoffen verunreinigt gewesen wären, was auszuschließen war. Um sicher zu gehen, dass die Versuchsbedingungen während der gesamten Versuchszeit für das Wachstum und die Anheftung der Zellen optimal waren, wurden Versuche zur Anheftung und Bestimmung der Pyritoxidation der Zellen durchgeführt.

Zellanheftung

Für die Zellablösung und die darauf folgende EPS-Gewinnung von sessilen Zellen war es wichtig, dass die Pyritoberfläche quantitativ von den Zellen besiedelt wurde. Daher wurde die Anheftung von Zellen des Stammes R1 von *A. ferrooxidans* an Pyrit gemessen. Dabei ergab sich, dass innerhalb der ersten 2,5 min 32% des Inokulums (3×10^{10} Zellen pro g Pyrit) an Pyrit angeheftet haben. Auch Kock fand bei der Untersuchung zum Anheftungsverhalten von *A. ferrooxidans* Stamm R1 heraus, dass bereits nach 2,5 min etwa 40% der Zellen an Pyrit anheften. Die Zahl der planktonischen Zellen erreicht in meinen Versuchen nach 24h einen Tiefstwert von 28% des Inokulums. Das legt die Vermutung nahe, dass 72% der Zellen des Inokulums (7×10^{10} Zellen/g Pyrit) zu diesem Zeitpunkt an das Pyrit angeheftet haben. Allerdings handelt es sich bei diesem Wert nur um eine Näherung, da streng genommen nur von einer Abnahme der planktonischen Zellzahl gesprochen werden kann. Diese kann nicht in eine konkrete Zahl der sessilen Zellen umgerechnet werden, da eine Vermehrung sowohl der planktonischen als auch der sessilen Zellen binnen 24h zumindest theoretisch möglich gewesen wäre. Zenneck (1988) hat für die Zellen des Stammes R1 von *A. ferrooxidans* während des Wachstums auf Eisen(II)-Ionen eine Generationszeit von 7,2h festgestellt. Eine Angabe zur Generationszeit von Zellen dieses Stammes mit dem Substrat Pyrit ist jedoch schwierig und hätte den Rahmen dieser Arbeit gesprengt, da – wie hier gezeigt – die Ablösung der sessilen Zellen von Pyrit mit Schwierigkeiten verbunden und eine direkte

Zählung der Zellen somit nicht möglich ist. Fowler und Crundwell (1999) konnten allerdings über die Oxidationsraten der Kulturen indirekt zeigen, dass die Generationszeit von mit Pyrit wachsenden Zellen von *A. ferrooxidans* Stamm FC1 mit der mit Eisen(II)-Ionen wachsenden Zellen nahezu identisch ist (6,1 bis 9,6h). Es ist davon auszugehen, dass dies auch für andere Stämme von *A. ferrooxidans* zutrifft. In meinen Versuchen nahm die Zahl der planktonischen Zellen nach 52h jedoch wieder zu. Die Zunahme könnte mehrere Gründe haben. Einerseits könnten sich die planktonischen Zellen vermehrt haben oder auch die sessilen Zellen oder beide gleichzeitig. Weiterhin könnten auch Zellen, die angeheftet waren, sich wieder abgelöst und somit die Zahl der Zellen im Überstand erhöht haben. Rodríguez et al. (2001) haben die Anheftung von Laugungsbakterien in drei Stadien eingeteilt, die sich auch in dieser Arbeit wieder finden lassen. Im ersten Stadium der Initiation heften die Zellen nach Rodríguez et al. mit maximaler Rate an. Diese Phase umfasst in dieser Arbeit die ersten 2,5 min. In der zweiten Phase nimmt die Anheftungsrate deutlich ab, da der Großteil der für die Anheftung zur Verfügung stehenden Oberfläche bereits belegt ist. Diese Phase endete in dieser Arbeit nach 24h Inkubationsdauer. Im dritten Stadium stellt sich schließlich ein Gleichgewicht zwischen den planktonischen und sessilen Zellen ein, da einige Zellen durch die lockere Bindung vom Pyrit abgelöst werden (reversible Adhäsion) und wieder zu planktonischen Zellen werden, während ein Teil der planktonischen Zellen an Pyrit anheften.

Dass die Zahl der Zellen nach ersten 72h Versuchszeit nicht weiter gestiegen ist, könnte an der hohen Zelldichte liegen, wie von Jensen und Web (1994) beschrieben wurde. Nach ihren Ergebnissen werden planktonische Zellen von *A. ferrooxidans* bei erhöhter Zelldichte im Wachstum gehemmt.

Pyritoxidation

Die Pyritoxidationsraten der beiden Stämme R1 und A2 in den 100 mL-Kolben unterscheiden sich mit den Werten von 8×10^{-7} ng Pyrit pro Tag und Zelle bzw. 7×10^{-7} ng Pyrit pro Tag und Zelle nicht allzu sehr von einander. Allerdings weichen die Werte in den 1L-Kolben bei dem Stamm R1 mit 1×10^{-7} ng Pyrit pro Tag Zelle von den anderen ab. Dies kann an einer besseren Sauerstoffzufuhr in den kleinen Kolben liegen. Mit den Versuchen zur Pyritoxidation sollte gezeigt werden, dass die Ernte der an Pyrit angehefteten Zellen bei jedem Ansatz in der gleichen Wachstumsphase erfolgte. Das bedeutet, dass sich die Zellen im gleichen physiologischen Zustand befanden.

Man kann davon ausgehen, dass während der einwöchigen Inkubationszeit die Anheftung nicht nur mit Pyritoxidation, sondern auch mit Biofilm- und EPS-Bildung einhergeht. Agate et al. (1969) zeigten, dass Zellen von *A. ferrooxidans* während des Wachstums mit Eisen(II)-Ionen EPS bilden. Sie zeigten auch, dass die Menge an EPS mit dem Verbrauch des Substrates steigt. Gehrke (1998) stellte fest, dass: 1. Zellen von *A. ferrooxidans* ohne EPS nicht an Pyrit anheften und 2. Auf Pyrit wachsende Zellen andere EPS bilden, als mit Eisen(II)-Ionen wachsende Zellen. Die Untersuchungen von Acharya et al. (1999) zeigten, dass an Pyrit adaptierte Kulturen während des Wachstums immer mehr EPS bilden, die an die Oberfläche des Metallsulfids binden. Fowler und Crundwell (1999) beobachteten außerdem, dass an Zinksulfid angeheftete Zellen von Exopolymeren überzogen sind. Alle diese Beobachtungen belegen, dass die Zellen der Art *A. ferrooxidans* während des Wachstums auf Sulfidmineralen oder mit Eisen(II)-Ionen EPS bilden. Diese Beobachtung konnte im Rahmen dieser Arbeit durch Kohlenhydratbestimmung von zellfreiem Überstand bzw. Wägung der gereinigten EPS nach Behandlung des bewachsenen Pyrits mit Detergenzien bestätigt werden.

Einfluss der Detergenzien auf Zellablösung

Mit Detergenzienzusatz lassen sich mehr Zellen von bewachsenem Pyrit ablösen als ohne Zusatz. Außerdem wurde hier gezeigt, dass eine Abhängigkeit der Detergenzien in ihrer Wirkung von den Versuchsbedingungen gibt. So zeigte ein Vergleich der Ablösung mit und ohne Einsatz von Detergenzien, dass in den Ansätzen ohne Detergenz bis zu fünfmal weniger Zellen von Pyrit abgelöst wurden, als in den Ansätzen, denen eines der vier Detergenzien wie z.B. Tween 20 beigemischt wurde. Weiterhin wurde bei der Ablösung der Zellen eine pH-Abhängigkeit festgestellt. So konnten bei einem pH von 7 fast doppelt so viele Zellen (90%) abgelöst werden als bei einem pH von 2 gewonnen wurden. Der Grund dafür ist, dass die Anheftung der Zellen einen pH-Wert (hier 2) voraussetzt. Dieser Wert ist kleiner als der isoelektrische Punkt des Analyten. Für Pyrit gewachsenen Zellen von *A. ferrooxidans* ermittelte Devasias et al. (1993) den isoelektrischen Punkt bei 3,8. Da ein pH-Wert von 7 den isoelektrischen Punkt des Analyten übersteigt, lösen sich die Zellen viel besser vom Pyrit ab (Gehrke, 1998). Bei der Ablösung der Zellen vom Mineral ist außer den chemikalischen Methoden wie Detergenzieneinsatz auch die Anwendung physikalischer Methoden förderlich. So konnten durch den Einsatz eines Ultraturrax zur Homogenisierung fast zweimal so viele

Zellen vom Pyrit abgelöst werden als ohne. Die bei der Homogenisierung wirkende Scherkräfte erhöhen den Ertrag an abgelösten Zellen. Die Kombination von chemischer mit physikalischer Zellablösung zur EPS-Extraktion bewirkt eine höhere Effektivität der Methoden, als die Verwendung von nur einem dieser Faktoren (Nielsen und Jahn, 1999). Basierend auf diesen Ergebnissen wurde für die Ablösung der Zellen vom Pyrit in dieser Arbeit stets eine Kombination dieser beiden Faktoren gewählt.

Bezüglich der Ablösung der Zellen von *A. ferrooxidans* Stamm R1 von Pyrit zeigten die vier Detergenzien Zwittergent, Triton X-100, Tween 20 und Tween 80 –angesetzt in den auf Seite 23 dieser Arbeit aufgeführten Konzentrationen- keinen Unterschied. Die Ergebnisse von García und Jerez (1995) bestätigen diese Beobachtung. Sie untersuchten die Ablösung von auf Schwefel gewachsenen Zellen der Art *A. ferrooxidans* Stamm ATCC 19859 mit Hilfe der Detergenzien Tween 20, Triton X-100 und NP-40. Sie fanden heraus, dass Triton X-100 zum Ablösen der Zellen das effektivste Detergenz war. Allerdings unterschieden sich die Zahl der abgelösten Zellen durch Behandlung mit Triton X-100 mit 4×10^8 Zellen pro mL nur gering von der Zahl der abgelösten Zellen durch eine Behandlung mit Tween 20 mit 2×10^8 Zellen pro mL. García und Jerez (1995) bestimmten diese Zellzahlen mit Hilfe einer Helber-Zählkammer. Somit kann auch bei ihnen von dem gleichen, hohen Messfehler ausgegangen werden wie in meiner Arbeit. Das relativiert das unterschiedliche Ergebnis der beiden Untersuchungen. Die Anheftung der Zellen beruht auf sowohl elektrostatische als hydrophobe Wechselwirkungen der Zelloberfläche bzw. der EPS mit Pyrit (Gehrke, 1998). Nicht ionische Detergenzien wie Tween 20, Tween 80 und Triton X-100 können die hydrophoben Wechselwirkungen kompensieren. Zwitterionische Detergenzien wie Zwittergent heben die elektrostatischen Bindungen auf. Daher unterscheidet sich die Wirkung dieser vier Detergenzien beim Ablösen der Zellen vom Pyrit nicht. Auch die Verlängerung der Einwirkzeit der Detergenzien erbrachte keine Steigerung der Zahl abgelöster Zellen. Deren Zahl schwankte zwischen 1 und 5×10^9 Zellen pro g Pyrit bei Einwirkzeiten von 15 bis 60 min. Dass eine Erhöhung der Einwirkzeit die Zahl der abgelösten Zellen vom Pyrit nicht erhöht, zeigt, dass bereits eine Inkubation von 15 min mit einem Detergenz vollkommen ausreicht, damit sie ihre Wirkung voll entfalten können. Die Detergenzien haben also offensichtlich keine Schwierigkeiten, in den Biofilm hinein zu diffundieren und die Zellen abzulösen. Bei den Versuchen zur Zellablösung bei unterschiedlich langen Einwirkzeiten der Detergenzien, die an Zellen des Stammes A2 der Art *A. ferrooxidans* durchgeführt wurden, konnten keinen signifikanten Unterschiede gegenüber den Ergebnissen der Versuche mit dem

Stamm R1 festgestellt werden. Da die EPS-Zusammensetzung von Stamm zu Stamm variieren kann und auch abhängig von den Nährstoffbedingungen ist (Gehrke 1998, Flemming und Wingender 2002), könnte die Bindung der EPS zum Pyrit unterschiedlich stark ausgeprägt sein. So könnte auch die Bindung von R1 und A2 zu Pyrit im Vergleich zu einander unterschiedlich stark sein. Daher hätten sich die gleichen Zellablösungsmethoden bei verschiedenen Stämmen unterschiedlich auswirken können, was aber auf die hier vorliegenden Untersuchungen nicht zutrifft.

Eine, die Ablösung fördernde Wirkung der Eisen(II)-Ionen auf bereits angeheftete Zellen ist, verglichen mit der Wirkung der Detergenzien, gering. Ein Zusatz von Eisen(II)-Ionen zu den Detergenzien erhöhte im Vergleich zu den Versuchen ohne Zusatz zu den Detergenzien die Zahl der abgelösten Zellen nicht. Die Zellzahlen schwanken zwischen 3 und 6×10^9 statt 1 bis 5×10^9 Zellen pro g Pyrit. Die Zugabe von Eisen(II)-Ionen beruhte auf den Beobachtungen von Blake et al. (2001). Sie haben festgestellt, dass die Zugabe von Eisen(II)-Ionen zu planktonischen Zellen von *A. ferrooxidans* bzw. zu extrahiertem Aporusticyanin die Anheftung beider an Pyrit hemmt. Aporusticyanin ist die Apo-Form eines Kupfer-Proteins, das von Zellen, die mit Eisen(II)-Ionen wachsende, in großen Mengen produziert wird. Die Beobachtung von Blake et al. geht mit der Annahme einher, dass die Adhesion der mit Eisen(II)-Ionen-gewachsenen Zellen an Pyrit zu einem großen Teil durch spezifische Bindungen zwischen Zellwand-Bestandteilen, dem Aporusticyanin, und Eisen(II)-Ionen im Pyritgitter vermittelt wird. Wenn die Bindungsstellen der zellulären Komponenten durch die hinzu gegebenen Eisen(II)-Ionen bereits belegt sind, kann keine Bindung zwischen den Zellen und den Eisen(II)-Ionen des Pyritgitters mehr stattfinden. Allerdings wurde Aporusticyanin von Blake et al. (2001) weder in der „outer membrane“ noch in der EPS nachgewiesen, so dass die Richtigkeit dieser Theorie noch nicht erwiesen ist. Bislang wurde Aporusticyanin nur im Periplasma von *A. ferrooxidans* gefunden, wo es keinen Kontakt mit der Pyritoberfläche hat (Bengrine et al. 1998). Die Untersuchungen dieser Arbeit zeigen nun, dass freie Eisen(II)-Ionen die Eisen(II)-Ionen aus dem Pyritgitter nur in geringem Maß von der von Blake et al. (2001) postulierten Bindung mit Aporusticyanin verdrängen können, da sie kaum Zellen von der Pyritoberfläche lösen. Möglich ist auch, dass die durch Aporusticyanin vermittelte Anheftung der Zellen an Pyrit eine viel geringere Rolle spielt, als von Blake et al. angenommen.

Eine Steigerung der Zahl abgelöster Zellen konnte durch die Verlängerung der Homogenisierungszeit von 3 auf 10 min oder durch den Einsatz von Detergenzien in einer

Konzentration von 1,5% erzielt werden. Auch hier waren wieder keine Unterschiede zwischen den vier Detergenzien feststellbar. Die Verlängerung der Homogenisierungszeit ließ Scherkräfte länger auf die Biofilmmatrix wirken, was vermutlich zu der gemessenen Verbesserung der Ablöserate geführt hat. Die Erklärung für den erhöhten Ertrag an abgelösten Zellen nach dem Einsatz der Detergenzien in einer Konzentration von 1,5% kann über die CMC der Detergenzien gegeben werden. Die kritische Mizellbildungskonzentration, die CMC, stellt eine wichtige physikalische Eigenschaft der Detergenzien dar. Sie beschreibt die Tensidkonzentration, bei der die Mizellbildung einsetzt. Die Erhöhung der Konzentration über diesen Punkt hinaus führt zu einer Vergrößerung der Zahl der Mizellen bzw. der einzelnen Mizellen selbst. Die CMC muss mindestens vorhanden sein, damit ein Detergenz überhaupt wirken kann. Da die CMC der einzelnen Detergenzien niedrig sind (Zwittergenz= 0,07%, Tween 80= 0,001%; Tween 20= 0,007%; Triton X-100= 0,02%), sorgt eine Erhöhung der Konzentration der Tensiden auf 1,5% für eine Erhöhung der Zahl der Mizellen. Je höher dabei die Mizellenanzahl steigt, desto besser kann ein Detergenz wirken (Neugebauer, 1988). Selbst wenn die Tensidmoleküle keine Mizellen um die Bakterienzellen bilden, sondern ein Monolayer zwischen Pyritoberfläche und Biofilm, träge diese Aussage zu. Je mehr Tensidmoleküle in der Suspension vorhanden sind, umso mehr Detergenzmoleküle können in Konkurrenz mit den Bindungen durch EPS-Molekülen an Pyrit und ggf. mit den Proteinbindungen mit der Oberfläche des Pyrits treten und die Zellen von der Pyritoberfläche ablösen. Daher führte der Einsatz der Tenside in erhöhter Konzentration zur verbesserten Zellablösung. Der unerwünschte Nebeneffekt einer Zerstörung von Zellen war trotz des Einsatzes der Detergenzien in einer Konzentration von 1,5% nicht zu beobachten. Bei den Versuchen zur Zellablösung empfiehlt es sich also, die Konzentration der Detergenzien auf mind. 1,5% zu erhöhen.

Bei den Untersuchungen konnte festgestellt werden, dass eine gleichzeitige Veränderung der Faktoren Homogenisierungszeit und Detergenz- Konzentration zu keiner weiteren Steigerung der Effektivität gegenüber der Veränderung nur eines der beiden Faktoren führt. Die Zahl der abgelösten Zellen schwankte im Kombinationsversuch zwischen 3 und 5 x 10¹⁰ Zellen pro g bewachsenem Pyrit. Es ist daher ausreichend, entweder Homogenisierungszeit oder die Konzentration der Detergenzien bei den Methoden der Zellablösung zu verändern.

Der Einsatz von DTT hat sich nicht als zweckmäßig erwiesen. Durch die Behandlung vom mit *A. ferrooxidans* Stamm R1 bewachsenen Pyrit mit dem Agenz DTT wurden 2 x 10⁹ Zellen pro g Pyrit abgelöst. Diese Zellzahl liegt im Rahmen dessen, was auch beim Einsatz mit

Detergenzien erhalten wurde. Allerdings war der zellfreie Überstand nach Einsatz von DTT mit KDO verunreinigt. DTT ist daher kein geeignetes Agens für die Ablösung der Zellen vom Untergrund. Als ein reduzierendes Agens kann DTT die S-H-Bindungen in Zellwandproteinen aufbrechen, sodass die Zellwand (zumindest Partikel) zerstört werden kann und eventuell Zellinhalte austreten.

Die Untersuchungen zur Ablösung der sessilen Zellen des Stammes R1 vom Pyrit ergaben, dass Tween 20 mit einer Konzentration von 1,5% bei einer Homogenisierungsdauer von 3 min das effektivste Detergenz ist. Dabei wurden 6×10^{10} Zellen pro g Pyrit abgelöst. Bei der Anheftung der Zellen an Pyrit spielen nach Untersuchungen von Gehrke (1998) die elektrostatischen Wechselwirkungen eine größere Rolle als die hydrophoben. Dass mit Hilfe eines nicht ionischen Detergenz viele angeheftete Zellen vom Pyrit abgelöst werden, könnte ein Hinweis darauf sein, dass die hydrophoben Wechselwirkungen bei der Anheftung der Zellen doch einen größeren Einfluss haben als bisher von Gehrke (1998) angenommen.

Einfluss der Detergenzien auf EPS-Gewinnung

Es wurde bei Beginn der Untersuchungen angenommen, dass, je mehr Zellen von Pyrit abgelöst werden, desto mehr EPS gewinnbar sein sollte.

Die Ablösung der Zellen bzw. der EPS durch ein Detergenz könnte sich auf zwei Wege abspielen:

1. Die Zellen werden entweder mit ihrer ganzen EPS oder nur mit einem Teil der EPS von der Mizelle umschlossen. Da die EPS hydrophobe Lipidanteile besitzen, wäre ein Einschließen der gesamten EPS möglich. Es können aber auch einzelne EPS-Flocken mizellisiert werden.
2. Die Monomere von Detergenzien können mit den Bindungen der EPS-Moleküle oder der Proteine der auf dem Pyrit anhaftenden Zellen konkurrieren und diese verdrängen. Sie könnten auf dem Pyrit ein Monolayer bilden und so die Zellen vom Mineral ablösen (Jozsa pers. comm.).

Da beide Mechanismen –elektrostatische und hydrophobe Wechselwirkungen zwischen den Zellen und der Pyritoberfläche –bei der Anheftung eine Rolle spielen können, ist es somit möglich, dass sowohl nicht-ionische als auch geladene Detergenzien Zellen und EPS der Zellen von *A. ferrooxidans* von Pyrit ablösen. Da beide Typen von Detergenzien eine ähnlich starke Wirkung zeigen, kann angenommen werden, dass elektrostatische und hydrophobe Wechselwirkungen die Hauptkräfte der Anheftung ausmachen.

Die Wirkung der vier Detergenzien auf EPS-Gewinnung war nach 30 min Einwirkzeit etwa gleich gut. Es wurden zwischen 0,2 und 0,37 mg EPS pro 10^{10} Zellen abgelöst. Durch eine Einwirkzeit von 45 min konnte die Menge an gewinnbaren EPS pro Zelle nach Behandlung mit Tween 20, Tween 80 und Triton X-100 deutlich erhöht werden. Es wurden zwischen 1,05 und 1,55 mg EPS pro 10^{10} Zellen gewonnen. Die Verlängerung der Einwirkzeit um 15 min erhöht den Ertrag an EPS bei diesen Detergenzien also um 2 bis 6-fache. Bei Zwittergent gab es keine Erhöhung des Ertrages an EPS nach der Erhöhung der Einwirkzeit. Vergleicht man die Ergebnisse der Zellablösung mit denen der EPS-Gewinnung, so sieht man, dass eine längere Einwirkzeit keinen erhöhenden Effekt auf die Ablösung von Zellen von Pyrit hat. Dagegen fördert sie die EPS-Ablösung. Durch die längere Einwirkzeit werden die hydrophoben Wechselwirkungen zwischen den Zellen bzw. der EPS der Zellen und dem Pyrit angegriffen und so viel EPS abgelöst. Eine quantitative Angabe über die elektrostatischen Bindungen zwischen EPS und Pyritoberflächen liegen bei den Untersuchungen von Gehrke (1998) nicht vor. Wenn also weniger elektrostatische Wechselwirkungen zwischen EPS und Pyritoberfläche vorhanden wären, als bisher angenommen, und dazu die Zahl an hydrophoben Wechselwirkungen die der elektrostatischen überwiegen würde, könnten mehr hydrophobe Kräfte und somit mehr Bindungen zwischen EPS und Pyritoberfläche durch die Einwirkung nicht ionischer Detergenzien aufgehoben werden. Das würde die Menge an gewinnbaren EPS erhöhen, wie es hier der Fall war.

Gehrke (1998) hat gezeigt, dass hydrophobe und elektrostatische Wechselwirkung für die Anheftung von EPS an Pyrit verantwortlich sind. Die Detergenzien greifen – abhängig von ihrer Ladung – diese Wechselwirkungen an und lösen die EPS von Pyrit. Die hydrophobe Kräfte werden von nicht-ionischen Detergenzien wie Tween 20 kompensiert, wohingegen elektrostatische Wechselwirkungen z.B. von Zwittergent geschwächt werden können. Die Zugabe von Eisen(II)-Ionen zur Detergenzienlösung steigerte die Menge an gewinnbaren EPS bei Zwittergent um einen Faktor von 21. Durch Zugabe der Eisen(II)-Ionen wurden 6 mg EPS pro 10^{10} Zellen gewonnen. Nach der Zugabe von Eisen-(II)-Ionen zu Tween 20 wurden 3,1 mg pro 10^{10} Zellen abgelöst. Das bedeutet eine Erhöhung des Gewinnungsfaktors auf 11. Eisen(II)-Ionen können aufgrund ihrer positiven Ladung an das negative Ende des Zwittergents binden. In die EPS-Matrix können Eisen(III)-Ionen komplexiert werden, so dass die EPS eine positive Oberflächenladung bekommt. Normalerweise könnten daher die positiv geladene EPS mit der negativen Ladung des Zwittergents wechselwirken. Durch die Bindung der Eisen(II)-Ionen an das Detergenz aber können die bereits mit Hilfe des Tensids von der

Pyritoberfläche verdrängte EPS nicht an diesem negativen Ende binden (Sekundärbindung der EPS an Detergenz, Jozsa pers. com.). Diese freie EPS sind besser zugänglich und können einfacher durch Zenrifugation vom Medium bzw. Detergenzlösung getrennt werden.

Die Erhöhung der Menge an gewinnbaren EPS kann durch eine Erhöhung der Tensid-Konzentration weiter gesteigert werden. Die EPS-Menge, bezogen auf 10^{10} Zellen, erhöhte sich bei dem Detergenz Tween 20 durch Erhöhung der Konzentration auf 1,5% und einer 30 minütigen Einwirkzeit um einen Faktor von 8 gegenüber den Ergebnissen des Versuches mit einer Detergenzkonzentration von 0,1 % bei gleicher Einwirkdauer. Die EPS-Menge betrug nach 30 min 2,26 mg pro 10^{10} Zellen. Die Behandlung der bewachsenen Pyritmasse mit dem Zwittergent in einer Konzentration von 1,5% erhöhte die Menge an gewinnbaren EPS um einen Faktor von 2,5 im Vergleich zu dem Ergebnis der Versuche mit 0,03%-igem Zwittergent. Auch hier lässt sich vermuten, dass das Detergenz zunächst mit den Zellen reagiert und überschüssige Moleküle dann auch zellfreie EPS einschließen. Aus Zeitgründen war es nicht möglich, die Versuche mit Triton X-100 und Tween 80 in einer Konzentration von 1,5% durchzuführen.

Diese Versuchsergebnisse zeigen, dass eine hohe Anzahl an abgelösten Zellen nicht unbedingt eine hohe Menge an EPS zur Folge haben muss. Daher kann man schließen, dass bei gleicher Zellzahl durch Variation von Methoden zur Ablösung unterschiedlich viel EPS von Pyrit abgelöst werden können.

Insgesamt kann aus den Ergebnissen geschlossen werden, dass Zwittergent in einer Konzentration von 0,001% mit Zusatz von 0,03% Eisen(II)-Ionen die beste Kombination für die EPS-Gewinnung ist. Die beste Methode für eine Ablösung sessiler Zellen von Pyrit ist die Anwendung von Tween 20 in einer Konzentration von 1,5% mit einer Homogenisierungszeit von 3 min. Die Zahl der abgelösten Zellen steht somit nicht im direkten Zusammenhang mit der gewinnbaren EPS-Menge. Im Rahmen dieser Arbeit konnten die Wirkung eines Detergenz-Zusatzes in einer Konzentration von 1,5% kombiniert mit einem Zusatz von Eisen(II)-Ionen bei der EPS-Gewinnung aus Zeitgründen nicht untersucht werden. Auch die Kombination eines Detergenz-Zusatzes in einer Konzentration von 1,5% in Kombination mit einer Homogenisierungszeit über 3 min wurde hier nicht bei der EPS-Gewinnung untersucht. Außerdem ist die Wirkung einer verlängerten Homogenisierungszeit von über 3 min in Kombination mit einem Detergenz-Zusatzes in einer Konzentration von 1,5% und Zusatz von Eisen(II)-Ionen auf die EPS-Gewinnung in dieser Arbeit aus Zeitgründen nicht untersucht worden.

Weitere Untersuchungen sollten sich mit anderen Detergenzien und Konzentrationen befassen. Unter anderem könnte die optimale Konzentration ermittelt werden, bei der die größtmögliche Menge an EPS von den Zellen auf Pyrit abgelöst werden kann, ohne die Zellen zu schädigen. Außerdem sollte der Effekt der Zugabe von Eisen(II)-Ionen zu Detergenzien auf die EPS-Gewinnung weiter untersucht werden. Es ist vermutlich unmöglich, die gesamten angehefteten EPS vom Pyrit abzulösen, da diese sich in den Rissen befinden können und somit stark mit dem Mineral verbunden sind (Escobar et al. 2002). Um zu überprüfen, ob eine quantitative Ablösung stattgefunden hat, könnten AFM (Atomic Force Microscopy)-Aufnahmen vor und nach der Behandlung der Pyritmasse bzw. Anfärben und CLSM-Aufnahmen (Confocale Laser Scanning Microscopy) (Neu und Lawrence, 1999) erste Hinweise liefern. Aus Zeitgründen war die Durchführung derartiger Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich. Außerdem könnte eine chemische Analyse der Bestandteile, der durch verschiedene Behandlungsmethoden abgelösten EPS zeigen, ob diese verschieden zusammengesetzt sind.

6. Literaturverzeichnis

Acuña, J., I. Peirano und C.A. Jerez. 1986. In vivo and in vitro methylation proteins from chemolithotrophic microorganisms: A possible role in chemotaxis, *Biotechnol. Appl. Biochem.* **8**:309-317.

Beck, J.V. 1967. The role of bacteria in copper mining operation. *Biotech. Bioeng.* **9**: 487-497

Bennett, J.C. und H. Tributsch. 1978. Bacterial leaching patterns of pyrite crystal surfaces. *J. Bacteriol.* **134**:310-317.

Blake, R.C. und E.A. Shute. 1994. Respiratory Enzymes of *Thiobacillus ferrooxidans*. Kinetic properties of an Acid-Stable Iron: Rusticyanin Oxidoreduktase. *Biochemistry* **33**: 9220-9228.

Blake, R.C., M.M. Lyles und R.C. Simmons. 1995. Morphological and physical aspects of attachment of *Thiobacillus ferrooxidans* to pyrite and sulfur, S.13-22. In T. Vargas et al. (Hrsg.), *Biohydrometallurgical processing Vol. I*. University of Chile, Santiago, Chile.

Blake II, R.C., Sasaki, K., Ohmura, N. 1999. Does aporusticyanin mediate the adhesion of *Thiobacillus ferrooxidans* to pyrite? *Hydrometallurgy.* **59**: 357-372

Brown, M.J., J.N. Lester. 1980 Comparison of bacterial extracellular polymer extractin methods. *Appl. Environ. Microbiol.* **40**: 179-185

Brierley J.A. 1978. Biogenetic extraction of uranium operations. *Biotech. Bioeng.* **9**: 487-497
Ebner H.G. 1978. Metal recovery and environmental protection by bacterial leaching of inorganic waste materials. In: LE Murr, AE Torma, JA Brierley (edc) *Metallurgical application of bacterial leaching and related microbiological phenomena*. Academic Press, New York, pp 195-206

Bruus J.H., P.H. Nielsen, K. Keidig. 1992. On the stability of activated sludge floc with implications to dewatering. *Wat. Res.* **26**: 1597-1604

Camper, A.K., M.W. LeChevallier, S.C. Broadaway und G.A. McFeters. 1985. Evaluation of procedures to desorb bacteria from granular activated carbon. *J. Microbiol. Methods* **3**: 187-198

Colmer, A.R., K.L. Temple und H.E. Hinkle. 1950 An iron-oxidizing bacterium from the acid drainage of some bituminous coal mines. *J. Bacteriol.* **59**: 317-328

DEV - Deutsche Einheitsverfahren zur Wasseruntersuchung. 1966. Verlag Chemie, Weinheim.

DEV - Deutsche Einheitsverfahren zur Wasseruntersuchung. 1984. Bestimmung von Eisen, E₁, S. 1-10. *In* Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung Verlag Chemie, Weinheim.

Devasia, P., K.A. Natarajan, D.N. Sathyanarayana und G. Ramananda Rao. 1993. Surface chemistry of *Thiobacillus ferrooxidans* relevant to adhesion on mineral surfaces. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**:4051-4055.

DiSpirito, A. A. und O. H. Tuovinen. 1982. Uranous ion oxidation and carbon dioxide fixation by *Thiobacillus ferrooxidans*. *Arch. Microbiol.* **133**: 28-32.

Drobner, E., H. Huber und K. O. Stetter. 1990. *Thiobacillus ferrooxidans*, a facultative hydrogen oxidizer. *App. Environ. Microbiol.* **56**: 2922-2923.

Dubois, M., K.A. Gilles, J.K. Hamilton, P.A. Rebers und F. Smith. 1956. Colorimetric method for detemination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry* **28(3)**: 350-356

Duncan, D.W., P.C. Trussel, C.C. Walden, 1964. Leaching of Chalcopyrite with *Thiobacillus ferrooxidans*: Effect of surfactants and shakig. *APPL. Microbiol.* **12**: 122-126

Edwards, K.J., P.L. Bond und J.F. Banfield, 2000. Characteristics of attachment and growth of *Thiobacillus caldus* on sulphide minerals: a chemotaxis response to sulphur minerals? *Environ. Microbiol.* **2**(3): 324-332

Ehrlich, H.L. 1996. *Geomicrobiology*. 3rd edition Marcel Dekker, New York.

Escobar, B., G. Huerta und J. Rubio, 1997. Short Communication: Influence of lipopolysaccharids on the attachment of *Thiobacillus ferrooxidans* to minerals. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. **18**: 875-879

Escobar, B. und I. Godoy 2002. Enumeration of *Acidithiobacillus ferrooxidans* adhered to agglomerated ores in bioleaching processes. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. **13**: 593-594

Flemming, H-K. J. Wingender. 2000. Extrazelluläre polymere Substanz (EPS)- der Baustoff für Biofilme. Sonderausdruck aus *VOM Wasser* **94**: 245-266

Flemming, H-K. J. Wingender. 2002. Was Biofilme zusammenhält. *Chemie in unserer Zeit*. **36** (1):30-42

Friedrich A. 1991. Untersuchung zur Überlebensrate ruhender Zellen bei stark acidophilen Bakterien . Diplomarbeit, Universität Hamburg

Frølund, B., T. Griebe, P.H. Nielsen. 1995. Enzymatic activity in activated sludge floc matrix. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **41**:708-716

Gehrke, T. Hallmann, R. und Sand, W. 1995. Importance of exopolymers from *Thiobacillus ferrooxidans* and *Leptospirillum ferrooxidans* for bioleaching. S. 1-11 *In* T. Vargas et al. (Hrsg.), *Biohydrometallurgical processing Vol. I*. University of Chile, Santiago, Chile.

Gehrke, T. 1998. Bedeutung extrazellulärer polymerer Substanzen von *Thiobacillus ferrooxidans* für die Besiedlung und Laugung von Pyrit und Schwefel. Doktorarbeit, Universität Hamburg

Gehrke, T., J. Telegdi, D. Thierry und W. Sand. 1998. Importance of extracellular polymeric substances from *Thiobacillus ferrooxidans* for bioleaching. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:2743-2747.

Hallmann R., A Friedrich, H-P. Koops, A. Pommerening-Röser, K Rohde., C. Zennek, W. Sand. 1993. Physiological characteristics of *Thiobacillus ferrooxidans* and *Leptospirillum ferrooxidans* and physicochemical factors influencia microbial metal leaching. *Geomicrobiol. Journal*, **10**: 193-206

Harrison jr., A. P. 1982. Genomic and physiological diversity amongst strains of *Thiobacillus ferrooxidans* and genomic comparison with *Thiobacillus thiooxidans*. *Arch. Microbiol.* **131**: 68-76.

Hensyl, W.R. und L.E. Forlifer (Hrsg.). 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 9. Ausg., Williams& Wilkins Company, Baltimore.

Ingledeu, W.J. 1982. *Thiobacillus ferrooxidans*: The bioenergetics of an acidophilic, chemolithotroph. *Biochem. Biophys. Acta.* **683**:89-117.

Jensen, A. B. und C. Webb. 1995. Ferrous sulphate oxidation using *Thiobacillus ferrooxidans*: a review. *Process. Biochem.* **30**: 225-236.

Jones, G.E. und H.W. Jannasch. 1959. Aggregate of bacteria in seawater as determined by treatment with surface active agents. *Limnol. Oceanogr.* **4**: 269-276.

Kelly, P. und A. P. Wood. 2000. Reclassification of some species of *Thiobacillus* to the newly designated genera *Acidithiobacillus* gen. nov., *Halothiobacillus* gen. nov. and *Thermithiobacillus* gen nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **50**: 511-516.

Klock, J. 2003.

La Lane, D. J., A. P. Harrison jr., D. Stahl, B. Pace, S. J. Giovanni, G. J. Olsen und N. R. Pace. 1992. Evolutionary relationships among sulfur- and iron-oxidizing eubacteria. *J. Bacteriol.* **174**: 269-278.

Leathen WW., SA. Sr. Barley, LD. McIntyre, 1953. The role of bacteria in the formation of acid from certain sulphuric constituents associated with bituminous coal. II Ferrous iron oxidizing bacteria. *Appl. Microbiol.* **1**: 65-68

Lee IY, WT Seo, GJ Kim, MK Kim, SG Ahn, GS Kwon, YH Park, 1997. Optimization of fermentation conditions for production of exopolysaccharide by *Bacillus polymyxa*. *Bioproc Engin* **16**: 71-75

Pace. 1992. Evolutionary relationships among sulfur- and iron-oxidizing eubacteria. *J. Bacteriol.* **174**: 269-278

Mackintosh , M.E. 1978. Nitrogen fixation by *Thiobacillus ferrooxidans*. *J. Microbiol.* **105**:215-218

Mitchell, D. 2002. Untersuchungen zum Verwandtschaftsverhältnis verschiedener Stämme von *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Acidithiobacillus thiooxidans* und *Leptospirillum ferrooxidans*, Diplomarbeit, Universität Hamburg.

Nasernejad, B., T. Kaghazchi, M. Edrisi, M. Sohrabi, 2000. Bioleaching of molybdenum from low-grade copper ore. *Process Biochemistry* **35**: 437-440

Neugebauer, J. 1988. A guide to the properties and uses of detergents in Biology and Biochemistry. San Diego Cal 1988.

Neugebauer J. 1990. Detergents: An overview . *Methods in Enzymology.* **182**: 239-253

Nielsen, P.H., A. Jahn, 1999. Extraction of EPS. Microbial polymeric substances. Characterisation, structure and function. 49-69

Olson G.J., W.P. Iverson, F.E. Brinckman, 1980. Volatilization of mercury by *Thiobacillus ferrooxidans*. Carnegie Institution of Washington Conference on organic matter in the ore deposits, Airline House, Warrenton, VA, Nov 9-12

Ohmura, N., K. Kitamura, H. Saiki. 1993. Selective adhesion of *Thiobacillus ferrooxidans* to pyrite. Appl. Environ. Microbiol. **59**: 4044-4050.

Ohmura, N. und R.C. Blake. 1997. Apourusticyanin mediates the adhesion of *Thiobacillus ferrooxidans* to pyrite, S. PB1.1-PB1-10. In International Biohydrometallurgy Symposium IBS '97 Biomine '97, Conference Proceedings. Australian Mineral Foundation, Glenside, South Australia, Australia.

Rodríguez, Y., A. Ballester, M.L. Blázquez, F. Gonzáles und J.A. Muñoz. 2001. Basic studies on bioleaching of chalcopyrite, sphalerite and pyrite. Biometallurgy: fundamentals. Technology and sustainable development. Part A.

Serva Feinbiochemica

Rojas-Chapana, J.A., 1998. Grenzflächen-Untersuchungen zur Biochemie des Abbaues von FeS₂ (Pyrit) durch *Thiobacillus ferrooxidans*. Doktorarbeit, Freie Universität Berlin.

Sharma, P.K., A. Das, K. Hanumantha Rao und K.S.E. Forssberg. 1999. *Thiobacillus ferrooxidans* interaction with sulfide minerals and selective chalcopyrite flotation from pyrite. Advances in flotation Technology, Eds. Parekh, B. K., Miller, J. D., SME 147-165

Scheraga, M., M. Meskill und C.D. Lichtfield. 1979. Analysis of methods for quantitative recovery of bacteria sorbed onto marine sediments, p. 21-39 In C. D. Lichtfeld and A. L. Segfried (ed.), Methodology of biomass determinations and microbial activities. American Society for Testing and Materials, Washington, D.C.

Schippers, A., W. Sand, 1998. Bacterial leaching of Metal Sulfides proceeds by two indirect mechanisms via Thiosulfate or via Polysulfides and Sulfur. *App. Environ. Microbiol.* **65**: (1): 319-321

Silverman, M. P. und H. L. Ehrlich. 1964. Microbial formation and degradation of minerals. *Adv. Appl. Microbiol.* **6**: 153-206.

Stevens, C. J., P. R. Dungan und O. H. Tuovinen. 1986. Acetylene reduction (nitrogen fixation) by *Thiobacillus ferrooxidans*. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **8**: 351-359.

Rehm, H. J. 1980. Mikroorganismen bei Metall- und Ölgewinnung – Laugung (leaching) von Metallen. *Industrielle Mikrobiologie*, Springer Verlag, Berlin.

Rodriguez-Leiva, M. und H. Tributsch. 1988. Morphology of bacterial leaching patterns by *Thiobacillus ferrooxidans* on synthetic pyrite. *Arch Microbiol* **159**:401-405.

Tributsch H. 1999. Direct versus indirect bioleaching, Teil A S. 51-60. *In* R. Amilis und A. Ballester (Hrsg.), *Biohydrometallurgy and the environment towards the mining of the 21st century*. Processings of the International Symposium San Lorenzo de El Escorial 1999. Madrid, Spain.

Tuovinen, O. H., S. I. Niemela und H. G. Gyllenberg. 1971. Tolerance of *Thiobacillus ferrooxidans* to some metals. *Antonie von Leeuwenhoek* **37**: 489-496.

Wang Y, B. McNeil, 1995. pH effects on exopolysaccharid an oxylic acid production in culture of *Sclerotium gluconicum*,. *Enzym. Microb. Technol.* **17**: 124-130

Whitfield, C. und M.A. Valvano. 1993. Biosynthesis and expression of cell-surface polysaccharide in Gram-negative bacteria. *Adv. Microbial Physiol.* **35**:136-246.

Woelk, E 2002. Untersuchung zur Wirksamkeit bakterizider Substanzen gegen Mykobakterien. Diplomarbeit, Universität Hamburg.

Yoon, W.B. and R. A. Rosson 1990. Improved method of enumeration of attached bacteria for study of fluctuation in the abundance of attached and free-living bacteria in response to diel variation in seawater turbidity. *App. Environ. Microbiol.* **56** (3): 595-600

Zenneck, C. 1988. Mikrobiologische Bestandsaufnahme in zwei rumänischen Erzbergwerken und Charakterisierung der lithotrophen Flora. Diplomarbeit, Universität Hamburg.

Diese Arbeit wurde in der Zeit vom 02. Januar 2004 bis zum 10. Dezember 2004 in der mikrobiologischen Abteilung des Biozentrums Klein Flottbek und Botanischer Garten der Universität Hamburg durchgeführt.

Danksagung

Herrn **Priv.-Doz. Dr. Wolfgang Sand** möchte ich für die Themenstellung, die Betreuung und sein Interesse an dieser Arbeit danken. Seine Anregungen und Ratschläge zur Versuchsdurchführung und zum literarischen Hintergrund haben mir sehr geholfen.

Kerstin Harneit danke ich für die wertvollen Tipps zur Versuchsdurchführung, der ständigen Hilfsbereitschaft und das kritische Lesen. **Dr. Tilman Gehrke** und **Florian Brill** danke ich für das kritische Lesen und ihre Bereitschaft zur Diskussion.

Herrn **Peter-Georg Jozsa** danke ich für seine interessanten Ratschläge und seiner Hilfestellung.

Außerdem danke ich meiner **Familie** für ihre Unterstützung, Hilfsbereitschaft und Verständnis während der gesamten Diplomarbeit.

Ich danke besonders meinem Freund, **Christian Karsten**, für seine Geduld und seine wertvolle Hilfe am Computer.

Meinen lieben Freundinnen **Seham** und **Ifey** für die erholsamen Kaffee-Stunden.

Mit einer Ausleihe meiner Arbeit in der Bibliothek bin ich einverstanden.

Ich versichere an Eides statt, dass zur Durchführung und Abfassung dieser Diplomarbeit keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet wurden.

Hamburg, den 10. Dezember 2004

Pamela Lazar